



**Hugo Miguel Amorim
Barbosa**

**Coextração supercrítica do óleo e de diterpenos do
resíduo de café**



**Hugo Miguel Amorim
Barbosa**

**Coextração supercrítica do óleo e de diterpenos do
resíduo de café**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica do Doutor Carlos Manuel Silva, Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Cláudia Passos, investigadora de pós-doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

*Aos meus pais,
Aos meus irmãos, Tiago e Ana Rita,
Aos meus tios, António e Helena.*

O júri

Presidente	Doutora Maria Inês Purcell de Portugal Branco Professor Auxiliar do Departamento de Química - Universidade de Aveiro
Arguente	Doutor Eduardo Luís Gomes Oliveira ISENSIS – I&D em Engenharia Química Lda.
Vogais	Doutor Carlos Manuel Santos da Silva Professor Auxiliar do Departamento de Química - Universidade de Aveiro (Orientador) Doutora Cláudia Pereira Passos Pós - Doutoranda do Departamento de Química – Universidade de Aveiro (Coorientador)

Agradecimentos

Ao professor Carlos Manuel Silva, pelos conhecimentos transmitidos, pelo apoio, motivação e amizade manifestados ao longo da minha jornada académica.

À Doutora Cláudia Passos, pela cooperação e amizade manifestadas.

Ao professor Francisco Avelino Silva, pela livre, total e sempre bem disposta colaboração na operação do extractor supercrítico. Pela amizade, pela prontidão e disponibilidade com que sempre atendeu as minhas dúvidas, um muito obrigado.

Ao colega e amigo Marcelo Melo, pelos conhecimentos partilhados e pelas observações dadas ao longo do presente trabalho. Pela amizade, prontidão e apoio manifestados, um muito obrigado.

Aos colegas e amigos, Simão Cardoso, José Pedro Aniceto, Bruno Antunes e Bruno Figueiredo, pelo companheirismo e amizade com que me acolheram e pela paciência manifestada nos meus momentos menos bons.

Aos meus tios, António e Helena, pelos valores humanos que me transmitiram, pelo amor e carinho com que me acolheram e por terem feito de mim uma melhor pessoa, um eterno e grato obrigado.

Aos meus irmãos e amigos, Tiago e Ana Rita, pelo apoio incondicional, pelo carinho, amor e amizade vividos cada dia desta aventura.

Aos meus pais.

Palavras-chave

Resíduo de café, extração supercrítica, compostos diterpênicos, metodologia de resposta de superfície , planeamento fatorial de experiências, óleo.

Resumo

O presente trabalho pretende otimizar as condições de extração supercrítica do óleo e compostos diterpênicos do resíduo de café recorrendo à metodologia de superfície de resposta com base no planeamento fatorial de experiências do desenho Box-Behnken. A otimização consistiu no estudo da influência das condições operacionais de pressão, temperatura e uso de cossolvente (etanol) nos intervalos de 140-190 bar, 40-70°C e 0-5 % (m/m), respectivamente.

Mediram-se três curvas cumulativas de extração nas condições de 190 bar/40°C, 190 bar/55°C e 140 bar/50°C, sem a presença de cossolvente, de modo a estudar o comportamento da extração do óleo e o perfil de extração dos compostos diterpênicos.

A identificação e a quantificação dos diterpenos maioritários Cafestol, Kahweol e 16-O-metilcafestol, efectuou-se por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), enquanto que, para o perfil de ácidos gordos presentes, recorreu-se à cromatografia em fase gasosa (GC).

A condição ótima para o máximo rendimento da extração do óleo é 190 bar/55°C/5 % (m/m) de etanol, enquanto que, para a extração de óleo rico em diterpenos, é 140 bar/40°C sem a presença de etanol, ambas obtidas por meio da metodologia de resposta de superfície.

Key-words

Spent residue coffee, supercritical extraction, diterpenic compounds, surface response methodology, design of experiments, oil.

Abstract

The present work aims to optimize supercritical fluid extraction of spent residue coffee and naturally occurring diterpenes by response surface methodology using Box-Behnken design. The influence of pressure, temperature and cosolvent (ethanol) conditions was studied in the range of 140-190 bar, 40-70°C and 0-5 % (w/w).

Three cumulative extraction curves were measured at 190 bar/40°C, 190bar/55°C and 140 bar/55°C, without cosolvent, and allowed the profiles along time of oil and diterpenes extraction to be known.

The identification and quantification of most abundant diterpenes (Cafestol, Kahweol and 16-O-methyl-cafestol) was achieved by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis, while the triglycerides fatty acids measurement was achieved by gas chromatography (GC).

Based on the response surface methodology results, the optimal conditions to maximize oil yield (% w/w) are 190 bar/55°C/5% (w/w) of ethanol, while maximum diterpenes concentration is obtained at 140 bar/40°C without ethanol.

**Índice**

Lista de Figuras.....	ii
Lista de Tabelas.....	iv
Nomenclatura.....	v
Enquadramento e objetivos	1
1. Introdução	3
1.1. Óleo de café	3
1.2. Fluidos supercríticos	6
1.3. Extração Soxhlet	13
1.4. Metodologia de superfície de resposta (RSM)	14
2. Materiais e Métodos.....	21
2.1. Extração Soxhlet	21
2.2. Extração supercrítica.....	21
2.3. Cromatografia em fase gasosa (GC)	25
2.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	26
3. Resultados e discussão	29
3.1. Extração em Soxhlet	29
3.2. Extração supercrítica.....	29
3.2.1 Óleo do resíduo de café.....	29
3.2.2 Diterpenos do óleo de resíduo de café.	33
3.3. Otimização da extração de óleo e diterpenos do resíduo de café	36
3.3.1 Rendimento mássico em óleo.	36
3.3.2 Rendimento em compostos diterpénicos	41
3.3.3 Concentração de diterpenos no óleo.	45
3.4. Considerações finais	49
4. Conclusões e sugestões de trabalho futuro	51
4.1 Conclusões.....	51
4.2 Sugestões de trabalho futuro.....	52
5. Bibliografia	53
Anexos.....	61



Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura molecular dos álcoois diterpênicos: a) Kahweol b) Cafestol c) 16- <i>O</i> -metilcafestol	5
Figura 2 - Transformação da fase gasosa e líquida do CO ₂ no estado supercrítico	6
Figura 3 - Diagrama de fases do CO ₂ no plano <i>P-V-T</i>	7
Figura 4 - Diagrama simplificado de um processo de extração supercrítica.	8
Figura 5 - Extração do óleo da grão de uva.....	12
Figura 6 - Desenho de um extractor soxhlet	14
Figura 7 - Pontos representativos das condições experimentais do desenho Box-Behnken.	15
Figura 8 - a) Extrator supercrítico no interior da estufa b) Painel de controlo c) Aquisição de dados.....	23
Figura 9 - Diagrama de fluxo da instalação de extração supercrítica	24
Figura 10 - Retas de calibração dos diterpenos maioritários do óleo de resíduo de café – a) Kahweol, b) Cafestol e c) 16 - <i>O</i> - metilcafestol. (A-área; C-concentração).....	27
Figura 11 - Perfil dos ácidos gordos em triacilglicerídeos maioritários do óleo do resíduo de café obtidos ao longo da extração supercrítica a 190 bar/55°C	30
Figura 12 - Curvas cumulativas da extração supercrítica do óleo de café.	31
Figura 13 - a) Óleo do resíduo de café recolhido no vaso de extração e diluído em etanol. b) Óleo do resíduo de café após remoção do etanol.....	31
Figura 14 - Comparação de curvas de extração supercrítica do óleo de resíduo de café do presente trabalho e de Couto <i>et al</i>	32
Figura 15 - Curvas cumulativas de extração normalizadas pelo valor do respetivo Soxhlet e massa de resíduo utilizado.....	32
Figura 16 - Solubilidade experimental do óleo de café para diferentes condições.	33
Figura 17 - Curvas cumulativas de extração dos diterpenos maioritários do óleo de resíduo de café. a) 190 bar/ 55°C e b) 140 bar/ 55°C. K –kahweol, C- cafestol e 16 - <i>O</i> - metilcafestol (mc).....	34
Figura 18 – Recuperação de diterpenos extraídos à condição de 190 bar/ 55°C.	34



Figura 19 - Diagrama de Pareto ($p = 0,05$). Influência relativa das variáveis no rendimento da extração do óleo. Os valores não significativos ($p < 0,05$) não atingem a barra vertical.

..... 38

Figura 20 - Resposta de superfície do rendimento em óleo para as temperaturas de 40°C (a) e 70°C (b). 41

Figura 21 - Diagrama de contorno do rendimento da extração de óleo a 40°C (a) e 70°C (b). 42

Figura 22 - Resposta de superfície do rendimento em diterpenos para as temperaturas de 40 ° C (a) e 55°C (b). 44

Figura 23 - Diagrama de Pareto relativo à concentração em diterpenos no óleo de resíduo de café. Os valores não significativos ($p < 0,05$) não atingem a barra vertical. 45

Figura 24 - Resposta de superfície da concentração de diterpenos no óleo de resíduo de café extraído com 0% (a) e 5% (b) de EtOH. 47

Figura 25 - Diagramas de contorno da concentração de diterpenos no óleo de resíduo de café operando com 0% (a) e 5% (b) de EtOH. 48

**Lista de Tabelas**

Tabela 1 - Composição (% , m/m) do café torrado de <i>Coffea arábica</i>	3
Tabela 2 - Composição lipídica do óleo do café torrado <i>Coffea arábica</i>	4
Tabela 3 - Principais ácidos gordos presentes nas estruturas dos triacilglicerídeos do óleo de café (grão torrado)	5
Tabela 4 - Valores característicos do estado gasoso, líquido e supercrítico [31].....	7
Tabela 5 - Breve revisão da extração supercrítica de extractos naturais nos anos de 2011-2012.....	10
Tabela 6 - Planeamento de experiências do desenho Box-Behnken para 3 níveis e 3 variáveis	15
Tabela 7 - Análise de variância para o modelo matemático de dados experimentais usando regressão múltipla	17
Tabela 8 - Perfil normalizado da composição global do óleo em ácidos gordos maioritários em triacilglicerídeos.	30
Tabela 9 - Composição do óleo e do resíduo de café em diterpenos.	35
Tabela 10 - Codificação das variáveis do desenho Box-Behnken.	36
Tabela 11 - Planeamento de experiências de acordo com o <i>design</i> de Box-Behnken e rendimento de óleo de café por massa de resíduo, η (% , m/m).	37
Tabela 12 - Coeficientes da regressão para o modelo geral da resposta de superfície (Equação 6) relativo ao rendimento em óleo.....	39
Tabela 13 - Análise ANOVA do rendimento do óleo do resíduo de café. Os valores a negrito representam os fatores significativos.	40
Tabela 14 - Coeficientes da regressão para o modelo geral da resposta de superfície do rendimento em diterpenos.	43
Tabela 15 - ANOVA do rendimento total de diterpenos no resíduo de café. Os valores a negrito representam os fatores significativos.	44
Tabela 16 - Coeficientes da regressão para o modelo geral da resposta de superfície do rendimento em diterpenos.	46
Tabela 17 - ANOVA da concentração total de diterpenos no óleo de resíduo de café.	47



Nomenclatura

AAO	Atividade antioxidante
C	Concentração
CCD	Desenho do composição central
DBB	Desenho de Box-Behnken
EtOH	Etanol
F	Probabilidade de Fischer
GL	Graus de liberdade dos quadrados da ANOVA
GC	Cromatografia em fase gasosa
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
MS	Média dos quadrados da ANOVA
RSM	Metodologia de superfície de resposta
P	Pressão (bar)
SC-CO ₂	Dióxido de carbono no estado supercrítico
SCF	Fluido supercrítico
SFE	Extração supercrítica
SS	Soma dos quadrados relativo à ANOVA.
T	Temperatura (°C)
x_0	Valor real da variável no ponto central do desenho de Box-Behnken
x_k	Variável real
X_k	Variável codificada

Letras Gregas

η	Rendimento mássico (% , m/m)
ρ	Massa volúmica (kg/m ³)
$\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$	Coeficientes do modelo da regressão



Enquadramento e objetivos

O café é uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo. Desde a sua introdução na Europa no século XVI os seus benefícios ou efeitos negativos na saúde humana têm sido motivo de debate contudo, muitas dúvidas ainda hoje se colocam devido à sua complexa composição [1]. Compostos como o Cafestol e o Kahweol, diterpenos presentes no óleo de café, apresentam propriedades anticancerígenas, particularmente na indução da glutathione S – transferase (GST) ou em aplicações de proteção solar.[2-5].

O consumo de café gera uma produção anual mundial de resíduos sólidos, resultantes da sua preparação, na ordem de 6 milhões de toneladas[6]. Em virtude desta quantidade significativa de resíduo de café gerado, a reutilização deste material torna-se um assunto de elevada relevância face ao potencial energético, antioxidante e de aplicação em tratamentos de doenças humanas [6-8]. Normalmente, estes resíduos de café são utilizados na indústria agrícola como fertilizantes. Estudos realizados nos últimos anos mostram a presença de compostos fenólicos associados a benefícios na saúde humana, quer diretamente pelo seu potencial antioxidante quer indiretamente, na ação contra a diabetes e doenças do foro neurodegenerativo [9, 10].

Diversas técnicas têm sido utilizadas na extração de compostos naturais, por exemplo, extração sólido - líquido com solventes orgânicos, extração assistida por ultrassons ou microondas, e extração com fluidos supercríticos [11, 12]. A extração supercrítica apresenta um conjunto de vantagens significativas em relação às técnicas convencionais de extração, nomeadamente, na extração de óleos: a flexibilidade do processo devido ao poder solvente e seletividade dos fluidos supercríticos, e a eliminação de solventes orgânicos e respetivos custos associados à sua eliminação dos extratos. O dióxido de carbono é o fluido supercrítico mais utilizado pois é seguro e de baixo custo e apresenta um ponto crítico de temperatura que permite a extração de substâncias sem a ocorrência de degradação térmica [13].

Neste âmbito, o objetivo do presente trabalho é o estudo da extração supercrítica do óleo de resíduo de café e a sua caracterização em diterpenos nas gamas de pressão 140-190 bar e temperatura 40 - 70°C, com ou sem uso de etanol (EtOH) como cossolvente. Em relação à estrutura da tese, está dividida em capítulos.

No Capítulo 1 abordam-se os conceitos relativos à composição do café, em particular, o óleo de café, e a extração do mesmo, por Soxhlet e com fluidos supercríticos.

No Capítulo 2 apresentam-se os procedimentos experimentais, listam-se os químicos e materiais utilizados, técnicas de análise e uma descrição sumária do equipamento de extração supercrítica.



O Capítulo 3 contempla a discussão dos resultados obtidos, nomeadamente, o rendimento em óleo e extração de diterpenos, as curvas cumulativas de extração e o estudo da influência dos parâmetros considerados na extração supercrítica por via da metodologia de resposta de superfície.

Por fim no Capítulo 4 compilam-se as principais conclusões obtidas pela elaboração desta dissertação e enunciam-se algumas sugestões de trabalho futuro.



1. Introdução

Neste capítulo apresentam-se as principais considerações teóricas a ter em conta no presente trabalho, nomeadamente, a composição do óleo e resíduo de café, e as técnicas de extração consideradas – Soxhlet e com fluidos supercríticos.

1.1. Óleo de café

Comercialmente, as duas espécies de café mais relevantes são *Coffea arabica* e *Coffea canefora* (variedade *robusta*) [14], sendo que na preparação da bebida do café a quantidade de óleo extraído é mínima, isto é, permanece maioritariamente nos resíduos sólidos remanescentes. Trata-se de um líquido castanho e viscoso caracterizado por um aroma de café e que representa cerca de 7-17 % (m/m, base seca) do resíduo, sendo o valor mais baixo o da espécie *robusta* [15].

O processo de torra do café ocorre numa gama de temperaturas entre 200° C e 250 °C onde se dão alterações físicas e químicas profundas. Os grãos de café aumentam entre 50 - 80 % o seu volume, adquirem cor acastanhada e sofrem uma perda de massa entre 13 - 20 %. É no processo de torra que se formam os compostos responsáveis pelo aroma do café [14]. Observa-se ainda que o resíduo evidencia atividade antibacteriana contra vários microrganismos, tais como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, devido à presença de compostos como a cafeína e os ácidos clorogénicos [16-18]. De acordo com a Tabela 1 pode observar-se que os principais constituintes do café torrado são polissacarídeos (30%) e lípidos (13%), sendo que a composição em lípidos não é afetada significativamente pelo processo de torrefação [19].

Tabela 1 - Composição (% , m/m) do café torrado de *Coffea arabica* [14] .

Proteínas	9	Lípidos	13
Polissacarídeos	30	Ácido fórmico	0.10
Sacarose	0.20	Ácidos clorogénicos	3.7
Glucose, fructose e arabinose	0.10	Cafeína	1.2

Os polissacarídeos são os compostos mais abundantes, quer nos grãos de café quer nos resíduos sólidos, e aquando da infusão do café verifica-se que 80% dos polissacarídeos permanecem no resíduo [20, 21]. Passos *et al* [22] observaram que os principais polissacarídeos presentes no resíduo de café são a manose (45 %, mol/mol), a galactose (25 %, mol/mol), a glucose (24 %,

mol/mol) e a arabinose (6%, mol/mol), formando estruturas poliméricas, nomeadamente as galactomananas, arabinogalactanas e celulose.

A Tabela 2 mostra que os lípidos presentes no café torrado são sobretudo triacilglicerídeos (78%, m/m) e diterpenos esterificados (15%, m/m), sendo a percentagem de diterpenos livres residual [14]. A composição em lípidos pode determinar-se por transesterificação direta nos correspondentes ésteres metílicos para posterior análise por cromatografia em fase gasosa [23]. Os triacilglicerídeos presentes no café são compostos por cadeias de ácidos gordos (cuja composição se encontra na Tabela 3) esterificados com o glicerol.

Tabela 2- Composição lipídica do óleo do café torrado *Coffea arabica* [14].

Composição	% mássica
Triacilglicerídeos	78.8
Ésteres diterpénicos	15.0
Diterpenos	0.12
Ésteres triterpénicos	1.8
Esteróides triterpénicos	0.34
Não identificados	4.0

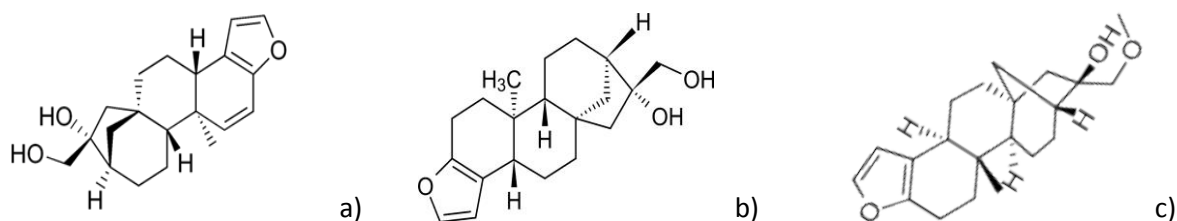
A quantidade de diterpenos presentes no resíduo de café depende do modo de preparação da bebida, nomeadamente do tempo de contacto entre a água quente e os grãos de café. Por exemplo, no café filtrado os níveis de Kahweol variam entre 0.06 e 2.66 mg/L, enquanto o Cafestol varia entre 0.26 e 5.30 mg/L. Já no café expresso os seus níveis assumem os valores de 1.2 – 8.0 e 4.0 – 16.0 mg/L, respetivamente [1]. Kurzrock *et al* [24] apresentam valores um pouco diferentes para o café do tipo *expresso* quando preparado com a espécie arábica; de acordo com o reportado por ele, a quantidade de cafestol é cerca de 26 mg/L e a de kahweol é 10 mg/L. No café filtrado a quantidade de diterpenos é residual dado que a fração lipídica é insolúvel na água e tende a migrar para a sua superfície ficando retida no filtro [25]. Os níveis significativos de diterpenos encontrados na bebida café *expresso* podem ser explicados pela combinação de dois efeitos, pela pressão elevada da água quente empregue na sua preparação e/ou pela estrutura mais compacta do bolo de grãos de café, levando a uma extração mais eficiente destes compostos [1].

Tabela 3 - Principais ácidos gordos presentes nas estruturas dos triacilglicerídeos do óleo de café (grão torrado) [26]

Composição		<i>Robusta</i>	<i>Arabica</i>
Palmítico	(C16:0) ^a	30.05-34.16	30.69 - 35.57
Esteárico	(C18:0) ^a	7.09 - 7.81	6.61 - 8.62
Oleico	(C18:1) ^a	11.28 - 13.17	7.33 - 13.11
Linoleico	(C18:2) ^a	40.83 - 44.40	41.41 - 47.80
Linolénico	(C18:3) ^a	0.78 - 0.93	1.04 - 1.69
Araquídico	(C20:0) ^a	2.94 -3.19	2.12 - 2.90

^a (Número de carbonos: grau de insaturação)

Entre os diterpenos, o cafestol e o kahweol, Figura 1, são os que mais atenção têm recebido, principalmente devido aos efeitos fisiológicos que lhes são atribuídos. Estão presentes exclusivamente no café e diferem entre si no grau de saturação relativo ao anel furânico do Kahweol (Figura 1a) [1]. Para além destes, há ainda o 16-*O*-metilcafestol (Figura 1c), maioritariamente presente na espécie *arabica* sendo este um marcador de distinção entre as duas espécies mais conhecidas. A maior parte dos diterpenos encontram-se esterificados com ácidos gordos, nomeadamente, ácidos palmítico e linoleico.

**Figura 1**- Estrutura molecular dos álcoois diterpénicos: a) Kahweol b) Cafestol c) 16-*O*- metilcafestol [1].

Recorrendo a diversos processos de separação, tais como a extração sólido-líquido em Soxhlet ou por fluidos supercríticos, pode obter-se o óleo de café dos resíduos sólidos. A quantificação dos diterpenos, no entanto, requer a sua separação da restante fração lipídica, nomeadamente os triacilglicerídeos. Usualmente, recorre-se à saponificação com hidróxido de potássio e etanol/metanol de modo a converter os esteres diterpénicos nos correspondentes álcoois diterpénicos a fim de determinar a quantidade total em diterpenos por cromatografia líquida (HPLC). Tendo em conta a natureza relativamente polar dos diterpenos e seus derivados, a escolha do solvente deve recair sobre o éter dietílico ou éter metilbutilico em detrimento do *n*-hexano e do éter de petróleo, solventes não polares [27]. A quantificação dos diterpenos livres no óleo requer a

separação prévia destes dos restantes compostos lipídicos, nomeadamente, os triacilglicerídeos e ésteres diterpénicos, sendo a cromatografia por permeação em gel uma opção viável [24].

Araújo *et al* [28] reportou a presença de 383.9 mg de cafestol e de 476.2 mg de kahweol em 100 g de grãos de café verde, sendo que após a torrefação as quantidades diminuíram para 328.5 mg e 397.80 mg, respetivamente, por via de uma extração em Soxhlet. Os diterpenos representam cerca de 1.3 % a 1.9 % (m/m) dos grãos da espécie *Coffea arábica* e 0.2 a 1.5 % na espécie *Coffea canefora* (variedade *robusta*) [29]. Kurzrock *et al* [27] mencionaram a composição de 0.15-0.37 % (m/m) de cafestol na espécie *robusta* e de 0.27 -0.67% na espécie *arábica*; de 0.11-0.35% de kahweol na espécie *robusta* e < 0.01% na espécie *arábica*; e de 0.06-0.18 % de 16-*O*-metilcafestol na espécie *robusta*. Dependendo do grau da torra, as referidas composições variam. No caso da extração supercrítica, operando entre as pressões de 235 e 380 bar e temperaturas entre 60 - 90 °C, as composições de cafestol nos grãos verdes variam entre 182.8 e 230 mg em 100 g de grãos e as do kahweol variam entre os 230.9 e 261.1 mg em 100 g de grão. No caso do café torrado as composições variam entre 94.4 e 122.2 mg em 100 g de grão e as do kahweol variam entre os 114.7 e 165.7 mg em 100 g de grão [28]. Quanto à presença de diterpenos na forma livre, i.e, não esterificados, calcula-se que se encontrem numa proporção entre 0.7 e 2.5 % da quantidade total mássica de diterpenos dos grãos verdes na espécie *arábica* e entre 1.1 e 3.5 % na espécie *robusta* [30].

1.2.Flúidos supercríticos

Estado supercrítico. Considera-se que um composto puro se encontra no estado supercrítico se a sua temperatura e pressão são superiores à temperatura e pressão do ponto crítico, situação física observada pela indistinção entre as suas fases gasosa e líquida (desaparecimento do menisco) observada na Figura 2. A mudança de propriedades acima do ponto crítico não ocorre subitamente, mas monotonamente [31].



Figura 2 - Transformação da fase gasosa e líquida do CO₂ no estado supercrítico [32].

Na região supercrítica de um composto, este apresenta densidades semelhantes à fase líquida, viscosidades próximas das dos gases e difusividades duas ordens de grandeza superiores às dos líquidos, tal como se pode observar na Tabela 4.

Na vizinhança do ponto crítico observam-se alterações significativas da densidade dos fluidos para pequenas alterações de temperatura, em processos isobáricos, ou pequenas alterações de pressão, em processos isotérmicos, factos que podem ser visualizados numa superfície P - T - ρ . Esta situação também pode ser descrita por uma superfície P - V - T , Figura 3, onde a isotérmica crítica apresenta um declive nulo, o que, indica que pequenas variações de pressão se traduzem num grande aumento de volume, isto é, a compressibilidade isotérmica dos fluidos supercríticos é elevada [33].

Tabela 4 - Valores característicos do estado gasoso, líquido e supercrítico [31].

Estado físico	Densidade (g.cm^{-3})	Difusividade ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$)	Viscosidade ($\text{g.cm}^{-1}.\text{s}^{-1}$)
Gás			
$P = 1 \text{ atm}, T = 15 - 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$	$(0.6 - 2.0) \times 10^{-3}$	$0.1 - 0.4$	$(0.6 - 2.0) \times 10^{-4}$
Líquido			
$P = 1 \text{ atm}, T = 15 - 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$	$0.6 - 1.6$	$(0.2 - 2.0) \times 10^{-5}$	$(0.2 - 3.0) \times 10^{-2}$
Supercrítico			
$P = P_c, T \approx T_c$	$0.2 - 0.5$	0.7×10^{-3}	$(1 - 3) \times 10^{-4}$
$P = 4P_c, T \approx T_c$	$0.4 - 0.9$	0.2×10^{-3}	$(3 - 9) \times 10^{-4}$

O ponto de inflexão da isotérmica $T = 31^{\circ}\text{C}$ (304 K) representa o ponto crítico do sistema, coincidindo com o máximo da curva de equilíbrio líquido-vapor. Assim, o ponto crítico pode definir-se, do ponto de vista matemático, como o ponto em que a derivada da pressão em ordem ao volume, a temperatura constante, é nula [34].

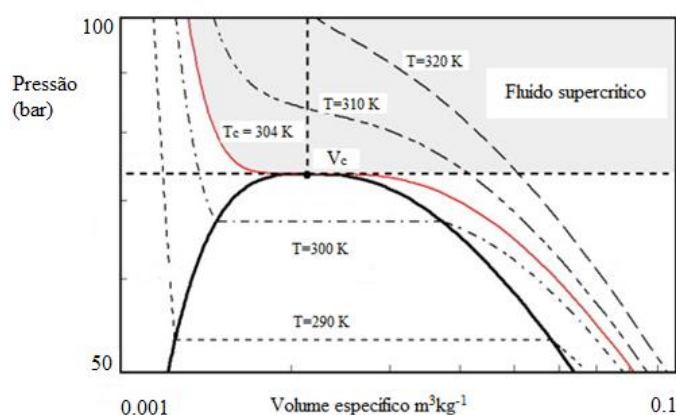


Figura 3 - Diagrama de fases do CO_2 no plano P - V - T [34].

A Figura 4 representa um esquema simplificado de uma unidade de extração com CO₂ supercrítico. É constituída pela alimentação do CO₂ e cossolvente (opcional), pela zona de extração e pela zona de separação. Após a zona de extração, o fluido é sujeito a uma perda de carga de modo a precipitar os produtos pretendidos. A linha onde ocorre a precipitação dos produtos deve ser aquecida devido à transição de fase do CO₂, que tende a congelá-la.

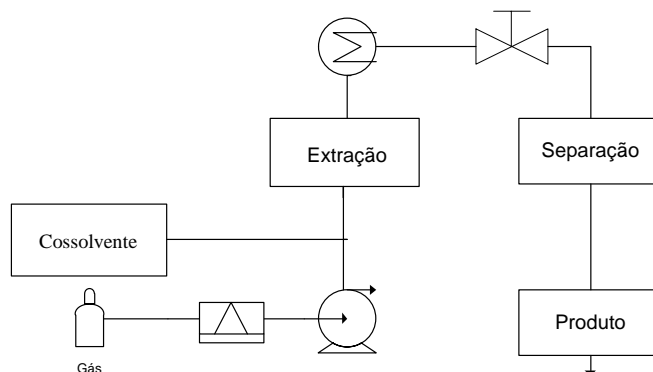


Figura 4 - Diagrama simplificado de um processo de extração supercrítica.

Extração de compostos naturais. Desde os finais de 1970 que os fluidos supercríticos têm vindo a ser utilizados na(o) extração/isolamento de produtos naturais, refletindo-se nas inúmeras publicações científicas existentes e no crescente interesse, por parte da indústria, pelo domínio das técnicas associadas à tecnologia supercrítica [13, 31]. Na Tabela 5 apresenta-se um breve resumo da extração de compostos a partir de matrizes naturais com fluidos supercríticos nos anos de 2011 e 2012. Contempla também os métodos de análise utilizados, a gama de operação praticada e o tipo de planeamento de experiências aplicado. O processo de extração supercrítica (SFE) consiste basicamente em dois passos – extração e separação. No extrator, o fluido em estado supercrítico (SCF) (solvente) escoa por entre a matriz sólida e dissolve os compostos (solutos). Na zona de separação a mistura soluto/solvente expande e o soluto precipita [33]. O dióxido de carbono é o SCF mais utilizado (condições críticas: 30.9 °C e 73.8 bar) devido às suas características – bom poder de solvatação, alta difusividade, barato, disponibilidade quanto à pureza elevada e não constitui um problema ambiental. Tendo em conta que se trata de um gás à temperatura e pressão ambientes, a sua recuperação é simples e proporciona produtos livres de solvente [31, 35]. A seleção das condições de operação depende do composto ou da família de compostos a extrair. Os parâmetros cruciais na SFE são a temperatura, o caudal, o tamanho das partículas, a pressão e cossolvente. As temperaturas elevadas reduzem a densidade (processo isobárico) do fluido o que se traduz num menor poder de solvatação. Não obstante, a pressão de vapor dos compostos a serem extraídos aumenta, assim como a probabilidade de passarem para a fase fluída. A pressão é o parâmetro crucial da extração, estabelecendo o poder de solvatação e repercutindo-se na seletividade do processo. Regra geral, o aumento da pressão conduz ao aumento da densidade e por



consequente ao aumento do poder de solvatação e diminuição da seletividade [13]. A eficiência da extração pode ser melhorada recorrendo ao pré-tratamento da amostra, por exemplo, recorrendo a enzimas que destroem a estrutura interna das células e facilitam a penetração do fluido em áreas, contendo óleo, que de outro modo seriam inacessíveis [36].

Outras aplicações. Hoje em dia a indústria farmacêutica requer o desenvolvimento de processos de produção com pequeno impacto sobre o meio ambiente, particularmente que reduzam o uso de compostos orgânicos voláteis, assim como a síntese de fármacos livres de resíduos. A diminuição da complexidade do processo e do número de passos envolvidos ajudam a sua compreensão e controlo, assumindo os fluidos supercríticos um papel relevante no cumprimento dos aspetos referidos [37, 38]. As principais aplicações no campo da indústria farmacêutica centram-se na purificação de excipientes farmacêuticos, extração de princípios ativos, quer dos meios reacionais quer de matérias-primas, separação de enantiómeros e processos de cristalização [39, 40]. Os fluidos supercríticos também podem ser utilizados em cromatografia como solvente na fase móvel. Pode utilizar-se quer em regime descontínuo quer em regime contínuo (SMB – *simulated moving bed*) na separação de isómeros [31].

Cossolvente. A fraca afinidade do dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂) para compostos polares requer a adição de um solvente polar em pequenas quantidades, tais como o metanol e o etanol. Na verdade, uma das primeiras aplicações comerciais do SC-CO₂, a descafeinação do café, recorre à adição de um cossolvente, a água [41]. São vastas as publicações que reportam melhorias na extração devido ao uso de cosolvente [23, 42, 43]. Embora a adição de cossolvente colmate algumas debilidades do dióxido de carbono supercrítico, no que diz respeito à dissolução de compostos polares, este aumento também se reflete numa possível perda de seletividade. Sendo o cosolvente um líquido, torna-se inevitável a introdução de um passo de separação posterior à recolha do material [13].

Tabela 5 - Breve revisão da extração supercrítica de extractos naturais nos anos de 2011-2012.

Nome comum	Nome científico	Tipo	Compostos	η (% m/m)	P (bar)	T (K)	CO ₂ & Cossolvente kg _{CO2} kg ⁻¹ extrato	Outras características	Técnica analítica	
	<i>Alnus glutinosa</i> L.	Casca	Betulina Ácido betulinico Lupeol	1.5-3.8	300-450	313 - 333	5-45 0-10 (% m/m) EtOH		GC-MS HPLC	[44]
	<i>Drosera intermedia</i>		Plumbagina	0.6	200	313	86.9		HPLC-DAD	[45]
Absinto	<i>Artemisia absinthium</i> L.			0.75-3.66	90-180	313 - 323	88-447,33 EtOH (-)			[46]
Araçá	<i>Psidium guajava</i>	Folha		1.3-3.9	100-300	309 - 327	0-5.8	Modelação Ultrasons Hidrodestilação	GC-MS	[47]
Boldo	<i>Peumus boldus</i> <i>M</i>	Folha		0.4-3.1	100	313	5.76			[48]
Cardo	<i>Cynara cardunculus</i> L.	Grainha		4.7-24	150-300	308-328	180	Produção biodiesel	GC HPLC	[49]
Chá	<i>Camellia sinensis</i> L.			14.8-29	50-90	308 - 318	400-1800 L _{CO2} kg ⁻¹ extrato	MRS AAO-DPPH	HPLC	[50]
Couve-nabiça	<i>Brassica napus</i>	Grainha		4.1-28.1	200-300	313-333	6.5-25	MRS Modelação	GC-MS	[51]
Erva de S.João	<i>Hypericum perforatum</i> L.			0-4.8	100-200	313-323	45	Modelação Otimização		[52]
Eucalipto	<i>Eucalyptus globulus</i>	Casca	Ácidos triterpénicos	0.0-1.3	100-200	313 - 333	80	Cinética Equilíbrio Propriedades	GC-MS	[53]

Lavanda	<i>Lavandula angustifolia</i>			5.5-9.8	72.7-207	319 - 326	1.1-12.3 L _{CO2} kg ⁻¹ extrato	MRS AAO	GC-MS	[54]
Linho	<i>Linum usitatissimum</i>			1.4-2.7	350-450	313 - 333	162	MRS	HPLC	[55]
Lipia	<i>Lippia dulcis.</i>			1.6-3.2	100-140	318-323	23.0		HPLC GC-MS	[56]
Manga	<i>Mangifera indica</i> L.	Folha	Mangiferina Quercetina		100-400	308-348	240 0-20 (% m/m) EtOH 0-20 (% m/m) MeOH	AAO	HPLC	[57]
Mangostão	<i>Garcinia mangostana</i> L.	Pericarpo	Xantonas	0.23-6.5	200-300	313-333	100-300	DBB AAO	HPLC	[58]
Morango	<i>Arbutus unedo</i> L.		Fenóis	6.29-25.3	150-300	313 - 353	30 0-20 (% m/m) EtOH	MRS- DBB AAO		[59]
Murta	<i>Myrtus communis</i> L.	Folha		0.5-6.3	100-350		0.24 L _{CO2} kg ⁻¹ MeOH	MRS-CCD ANOVA	GC-MS GC-FID HPLC	[60]
Pitanga	<i>Eugenia uniflora</i> L.	Fruta	Sesquiterpenos Cetonas	0.42 - 0.56	150-250	313 - 333	36	ANOVA	GC-MS	[61]
Satureja	<i>Satureja hortensis</i> L.		Carnosol Ácido rosmarinico	0.87-6.42	300-450	313	7 5-15 (% m/m) EtOH		GC-FID HPLC	[62]
Soja				2-19	300-500	313 - 333	17.9-20.0	Partícula Modulação Scale-up	Gravimetria	[63]
Tintureiro	<i>Alkanna tinctoria</i>		Corantes	0-1.47	50-300	303 - 353	30	DBB	HPLC	[64]
Uva	<i>Vitis vinifera</i> L.	Graíinha		13.42	350	313	12	Scale-up (Piloto) Avaliação económica		[65]

DAD - *Diodo array detector* – detetor de diodos; FID - *Flame ionization detector* - detetor ionização por chama; L - Linnaeus; MS - *Mass spectrometry* - espectrometria de massa

Curva cumulativa de extração. O processo de extração pode ser seguido graficamente representando a quantidade de extrato acumulado em função do tempo ou da quantidade de CO₂ consumido. A forma da curva cumulativa depende dos parâmetros processuais – temperatura, pressão, caudal e conteúdo de cossolvente – e dos fenômenos que ocorrem no interior da matriz sólida [31]. Pode observar-se pela Figura 5 que a temperaturas baixas e pressões elevadas a curva apresenta um comportamento crescente inicial mais acentuado do que nas condições opostas.

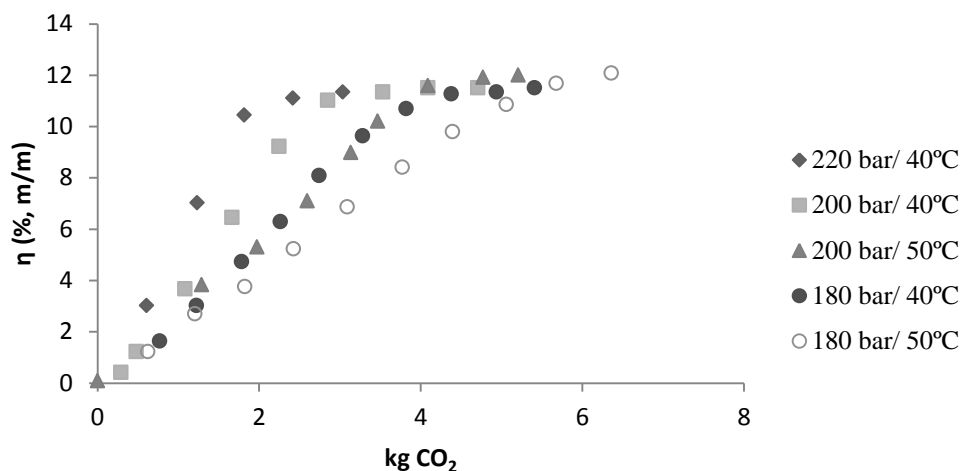


Figura 5 – Extração supercrítica do óleo da gráinha de uva [12].

O rendimento da extração é superior a pressões elevadas (a temperatura constante) devido ao aumento da densidade do SC-CO₂ com a pressão, e por conseguinte, a capacidade de dissolução aumenta. Já o efeito da temperatura é fruto da combinação de dois fenômenos de influência oposta - a diminuição da densidade do SC-CO₂ por aumento da temperatura e o aumento da pressão de vapor dos solutos, que aumenta a solubilidade no solvente supercrítico [13, 66].

Modelação matemática. A modelação matemática permite representar fisicamente o processo de extração, útil nos estudos de *scale-up*. Deve por isso refletir os fenômenos físicos que ocorrem ao longo da extração e próprios da matriz sólida [13]. Atualmente existem vários modelos que permitem a modelação das curvas cumulativas de extração baseados nos fenômenos de transferência de massa entre a matriz sólida e o (s) solvente (s). De acordo com o modelo proposto por Hong *et al* [69], a curva cumulativa de extração pode ser dividida em duas partes – extração rápida e lenta – em que na segunda parte predominam os fenômenos de resistência à transferência de massa no interior das partículas por difusão do soluto. O modelo permite a determinação do coeficiente de difusão efetiva, baseando-se no modelo de difusão de Fick. Destaca-se o modelo de Sovová [67], no qual se distinguem três períodos – extração do soluto das células rompidas na moagem para a fase supercrítica, transferência do óleo das células intactas para as células rompidas

e desta fase para o seio do fluido, e, por fim, a extração nas zonas de difícil acesso. O modelo permite a determinação do coeficiente de transferência de massa global, a massa de soluto inacessível por massa livre de soluto na fase sólida e a solubilidade no óleo no SC-CO₂. Zizovic *et al* [68], em 2005, apresentou um modelo em microescala em que a extração do óleo depende do tipo de estrutura secretória, distinta nas diferentes espécies de plantas. O modelo baseia-se num balanço material isotérmico e isobárico ao extrator e permite a determinação da concentração do óleo no SC-CO₂ na interface óleo/SC-CO₂, a determinação do coeficiente de transferência de massa e a difusividade do óleo.

1.3.Extração Soxhlet

Geralmente as amostras sólidas são difíceis ou mesmo impossíveis de processar nos instrumentos de análise usuais. Por conseguinte, a análise deste tipo de amostras requer a transferência do analito para a fase líquida, nomeadamente, por extração sólido-líquido. Em 1879, Franz von Soxhlet desenvolveu um sistema, ilustrado na Figura 6, capaz da extração de analitos sólidos sem recorrer à maceração e lixiviação das amostras reaproveitando o solvente utilizado, fazendo deste um processo de separação sólido-líquido de referência no último século [70]. E ainda hoje, trata-se de uma metodologia bastante simples e económica, em que a matriz sólida se encontra permanentemente em contacto com o solvente [70]. Por ação do calor, o solvente presente no balão de reebulição evapora até ao condensador, muda de fase e enche o cartucho Soxhlet. O material sólido encontra-se assim permanentemente em contacto com o solvente puro ocorrendo a solubilização do analito. O analito dissolvido é encaminhado para o sifão de recolha onde, após terminado o ciclo de extração, é descarregado no balão de reebulição. Um novo ciclo de extração se inicia pela evaporação do solvente livre do soluto, repetindo-se o processo descrito. Desta forma, a mesma quantidade de solvente é utilizada em todos os ciclos até que a matriz sólida se encontre livre de soluto, permitindo assim o uso económico do solvente [70].

Tendo em conta que o processo ocorre à temperatura de ebulição do solvente, o analito presente no balão de reebulição fica sujeito a essa mesma temperatura (por vezes elevada), podendo decorrer daí uma degradação térmica [71]. A eficiência deste tipo de extração depende das características da matriz sólida. A difusão interna dos solutos é condicionada pelo tamanho das partículas da matriz sólida [72].

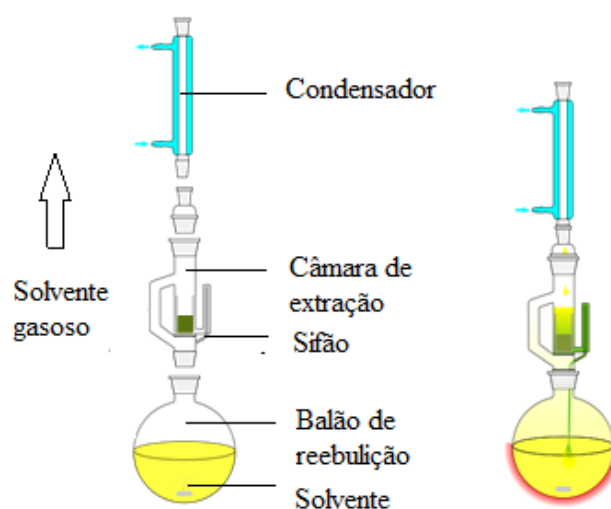


Figura 6 - Desenho de um extrator soxhlet [73].

1.4. Metodologia de superfície de resposta (RSM)

Um dos aspetos de maior relevância na extração supercrítica é a otimização das condições de operação. As variáveis processuais influenciam de forma distinta o rendimento e o tipo de compostos extraídos. É, portanto, necessário, estudar o modo como a variação das mesmas se repercute no objetivo pretendido, seja ele o rendimento mássico ou a concentração de diterpenos no óleo do presente estudo.

Planeamento fatorial de experiências. O uso do planeamento fatorial de experiências é uma estratégia útil no delineamento do mapa de experiências a realizar. Dependendo do tipo de estudo em questão pode aplicar-se diferentes tipos de planeamento de experiências, sendo que geralmente se aplicam um planeamento com 3 níveis de variação para cada fator. Não obstante, encontra-se também na literatura estudos com 2 ou 4 níveis. Os principais desenhos de planeamento fatorial de experiências são os testes ortogonais (TO), o desenho de Box-Behnken (DBB), o modelo de composição central (DCC) e a matriz Doehlert [74].

Desenho Box-Behnken. Proposto em 1960, trata-se de um modelo de três níveis para o ajuste do modelo das respostas de superfície [75]. Combina fatoriais 2^k num de bloco incompleto em termos de número de experiências, o que o torna uma opção eficiente e económica em relação aos correspondentes desenho 3^k [75, 76]. O estudo de Box-Behnken (DBB) não contempla qualquer

um dos vértices do cubo responsáveis pelos níveis inferiores e superiores de cada variável. A Tabela 6 mostra as combinações dos diferentes níveis de cada experiência e a Figura 7 os pontos do cubo representativos de cada experiência.

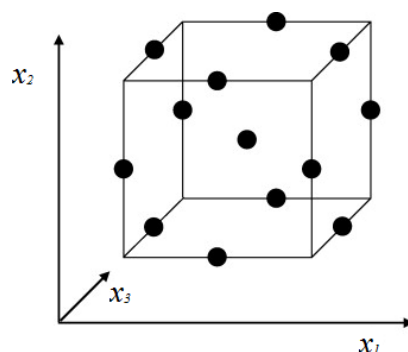


Figura 7 - Pontos representativos das condições experimentais do desenho Box-Behnken [74].

Tabela 6 - Planejamento de experiências do desenho Box-Behnken para 3 níveis e 3 variáveis [75].

Experiência	X_1	X_2	X_3	Experiência	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	0	9	0	-1	-1
2	-1	1	0	10	0	-1	1
3	1	-1	0	11	0	1	-1
4	1	1	0	12	0	1	1
5	-1	0	-1	13	0	0	0
6	-1	0	1	14	0	0	0
7	1	0	-1	15	0	0	0
8	1	0	1				

Torna-se assim vantajosa a sua utilização pois estes vértices podem representar combinações constrangedoras do ponto de vista físico ou de realização experimental [75]. Todos os fatores encontram-se ajustados em três níveis (-1,0,1) com intervalos equitativos em cada nível. DBB quando comparado com outros modelos de propósito semelhante é, a par com a matriz de Doehlert, mais eficiente que o modelo CCD e que os modelos de fatoriais completos [74]. Sendo que para um número de fatores superiores a três o modelo da matriz de Doehlert apresenta uma eficiência mais elevada que o modelo DBB [74].

Modelo matemático da resposta de superfície. A metodologia de superfície de resposta (RSM) é uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas úteis na modelação e análise de problemas, cuja

resposta é influenciada por várias variáveis, as quais se pretende otimizar [75]. Se a resposta da apresentar uma curvatura o modelo pode ser descrito por um polinómio de segundo grau traduzido pela equação:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \epsilon \quad \text{Equação 1}$$

em que β_0 , β_i , β_{ii} e β_{ij} são coeficientes do modelo; X_k representam as variáveis codificadas do processo e ϵ representa o erro associado ao sistema [75]. Determinam-se pelo método dos mínimos quadrados. Dada a complexidade dos cálculos matriciais envolvidos, estes são, geralmente, determinados recorrendo a ferramentas informáticas. As variáveis codificadas do processo, X_k , são obtidas a partir das variáveis reais pela equação:

$$X_k = \frac{x_k - x_0}{\Delta x_k} \quad \text{Equação 2}$$

em que x_k representa o valor real da variável codificada X_k e x_0 representa o valor real do ponto central e Δx_k representa o passo equidistante para cada nível [76].

A boa estimativa dos parâmetros do modelo depende da escolha do tipo de modelo e planeamento de experiências escolhido [75]. Na verdade, a RSM, é um modelo sequencial, pois muitas vezes a resposta de superfície que descreve o processo pode encontrar-se longe do ponto ótimo, isto é, as condições operacionais escolhidas podem estar afastadas das condições que proporcionariam a determinação do ponto ótimo de operação. Isto ocorre quando se desconhece por completo a relação das variáveis processuais e o impacto das mesmas no processo. Neste tipo de situações a primeira abordagem poderá servir apenas como uma indicação da localização da zona de operação [75].

ANOVA. O modelo matemático proposto deve ser alvo de uma análise de variância, ANOVA, de modo a avaliar a qualidade do ajuste à situação física em causa – Tabela 7. A ideia central da ANOVA é a comparação do tratamento entre as combinações dos diferentes níveis e os erros aleatórios inerentes às medições [76]. A análise ANOVA implica que os dados sejam bem modelados pela distribuição normal e de igual variância [77]. Transcrevendo o dito por Hall *et al* [77]: “(...) A técnica começa por decompor a variabilidade das respostas em duas componentes fundamentais- variabilidade no grupo e entre os grupos - pretendendo com isso testar a igualdade



dos efeitos mediante a comparação de duas estimativas diferentes da variância da população (...).”.

Tabela 7 - Análise de variância para o modelo matemático de dados experimentais usando regressão múltipla [76].

Fonte de variação	Soma dos quadrados	GL	Média dos quadrados
Regressão	$SS_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MS_R = \frac{SS_{reg}}{p - 1}$
Resíduos	$SS_E = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MS_E = \frac{SS_{reg}}{n - p}$
Falta de ajustamento	$SS_{fa} = \sum_i^m \sum_j^{n_1} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m - p$	$MS_{fa} = \frac{SS_{fa}}{m - p}$
Erro puro	$SS_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_1} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MS_{ep} = \frac{SS_{ep}}{n - m}$
Total	$SS_{TT} = \sum_i^m \sum_j^{n_1} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	

n_i , número de observações (15); m , número total de combinações no desenho (13); p número de parâmetros do modelo (10); \hat{y}_i valor estimado pelo modelo para cada nível i ; \bar{y} média global; y_{ij} réplicas em cada nível, \bar{y}_i média das réplicas em cada nível.

Testes de significância da regressão. O teste de significância da regressão é um teste para determinar a linearidade entre a variável de resposta e as variáveis da regressão [75]. As hipóteses são:

$$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_k = 0 \quad vs \quad H_1: \beta_j \neq 0, \text{ para pelo menos um } j.$$

Equação 3

A rejeição da hipótese nula, H_0 , implica a existência de pelo menos um parâmetro da regressão, X_i , que contribui significativamente para o modelo [75]. O teste envolve uma análise de variância na qual a soma dos quadrados total, SS_{TT} , é dividida na componente devido ao modelo ou regressão, SS_R , e na componente devido aos resíduos ou erros, SS_E [75]. O procedimento de teste para a não rejeição da hipótese nula é dado pelo valor da estatística de Fischer, F_0 , determinada pelo rácio da média dos quadrados da regressão, MS_R , e do resíduo, MS_E [75, 76]. Deve rejeitar-se a H_0 se F_0 exceder $F_{\alpha, k, n-k-1}$, ou alternativamente, se o valor-p for inferior à significância α para o

intervalo de confiança pretendido [75]. A maior parte dos cálculos são feitos recorrendo ao uso de *software* de estatística dado o tempo requerido.

Muitas vezes, é do interesse do analista, o teste de hipóteses nos coeficientes individuais da regressão ou num grupo de coeficiente. Nesse caso, o teste de hipóteses é

$$H_0: \beta_j = 0 \quad vs \quad H_1: \beta_j \neq 0$$

Equação 4

A não rejeição de H_0 indica que X_j pode ser eliminado do modelo. Utiliza-se a estatística $t_{student}$ para concluir quanto à significância dos coeficientes da regressão [75].

R^2 e $R^2_{ajustado}$. Tratam-se de parâmetros que permitem a avaliação da qualidade do ajuste, traduzindo-se numa medida da variabilidade da resposta obtido usando os parâmetros da regressão [77]. Contudo, valores superiores a 0,9 nem sempre reflectem um bom ajuste, pois a adição de parâmetros ao modelo aumenta sempre o R^2 [75, 77]. Por outro lado, o $R^2_{ajustado}$ embora seja construído partir do R^2 , é corrigido pelos graus de liberdade da regressão e dos resíduos [75, 76]. O $R^2_{ajustado}$ não é, geralmente, afectado pela adição de termos ao modelo, antes pelo contrário, a adição de termos não significativos pode diminuir o seu valor [75]. O valor entre os dois R^2 não deve diferir em demasia sob o risco da inclusão de termos não significativos [75].

Falta de ajustamento. A inclusão de pontos centrais no planeamento de experiência permite obter o erro experimental puro, dividindo desta forma a partição dos resíduos na componente de erro puro e falta de ajustamento (*lack of fit*) [75]. O teste estatístico para a significância de falta de ajustamento baseia-se no rácio entre a média dos quadrados de falta de ajustamento, MS_{fa} , e a média dos quadrados do erro puro, MS_{ep} , sendo este o valor da estatística de Fischer, F_0 [75, 76]. Compara-se o valor F_0 com o valor de $F_{\alpha, m-p, n-m}$, em que $m - p$ são os graus de liberdade de falta de ajustamento e $n - m$ os graus de liberdade do erro puro. Caso $F_0 < F_{\alpha, m-p, n-m}$ conclui-se a não existência de evidências que suportem a presença de falta de ajustamento [75].

Avaliação do modelo. A avaliação da adequação do modelo aos dados experimentais é importante para assegurar que ele proporciona uma aproximação verdadeira ao sistema real e a inexistência de alguma violação dos pressupostos assumidos no método dos mínimos quadrados [75]. Pode verificar-se essa adequação pelos gráficos de resíduos ou recorrendo ao PRESS, *Prediction Error Sum of Squares*. O PRESS permite o cálculo de um $R^2_{previsão}$ que indica a capacidade de previsão do modelo da regressão [75]. Determina-se pela equação:



$$R^2_{previsão} = 1 - \frac{PRESS}{S_{yy}} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{S_{TT}}$$

Equação 5

A capacidade de previsão com base neste critério tem mostrado resultados bastante satisfatórios [75].

Não se inclui no âmbito do presente trabalho a demonstração dos pressupostos das equações estatísticas utilizadas, pelo que se remete a consulta dos mesmos para a bibliografia referida.



2. Materiais e Métodos

Neste capítulo faz-se uma descrição dos materiais, métodos e equipamentos utilizados no presente trabalho.

2.1.Extração Soxhlet

Preparação da amostra. O resíduo de café foi obtido na máquina de venda automática do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, proveniente do pacote comercial Delta Cafés Platina (Portugal). As amostras foram secas de acordo com a ISSO/DIS 11294-1993 a 105 ° C durante um período de 8 horas [78].

Extração. Num cartucho de Soxhlet de dimensões 23 × 100 mm colocou-se a amostra (45 g) de resíduo de café. Utilizou-se como solvente 150 mL de *n*-hexano num balão de reebulição de 500 mL submergido num banho de água (Modelo: Grant, Keison international Ltd, Reino Unido) a 80° C. A extração decorreu durante 4 h. No final da extração remove-se o *n*-hexano no evaporador rotativo (Modelo: Rotavapor R-114, Buchi Water Bath B-480) a 40°C.

2.2.Extração supercrítica

Preparação da amostra. Recorreu-se ao mesmo procedimento descrito na seção 2.1.

Condições operacionais. Carregou-se em todas as experiências realizadas o vaso de extração com uma amostra seca de 60 g. As curvas cumulativas foram obtidas às pressões de 140 bar/55°C e 190 bar/ 40° e 55° C. Para a metodologia de resposta de superfície a pressão variou entre 140 e 190 bar, a temperatura entre 40°C e 70°C e a percentagem mássica de cossolvente entre os 0-5%. A combinação das condições operacionais realizou-se conforme o DBB. Em todas as experiências o caudal de CO₂ alimentado ao sistema foi de 12 g min⁻¹ de modo a perfazer o consumo de 5.5 kg.

Equipamento. Na Figura 9 é apresentado o diagrama de fluxo da unidade de extração supercrítica utilizada no presente trabalho. O CO₂ é alimentado ao sistema a partir de uma garrafa cuja pressão varia entre 45 e 55 bar. O CO₂ é arrefecido até entre -8 e -16 °C por um refrigerador com uma mistura de água e etilenoglicol, mantendo desta forma o CO₂ no estado líquido. O líquido é comprimido, aproximadamente a 320 bar, para o interior de um acumulador pela bomba B.1 (Modelo: MCPV-71, Haskel, EUA). A bomba encontra-se num estado alternativo on-off, através da válvula eléctrica V.1 (Modelo: PL-VS 178, Paralab, Portugal) conetada ao acumulador, que atua quando a pressão baixa até 280 bar e desliga quando atinge 360 bar. À bomba B.1 encontra-se

associado um sistema de purga que atua antes da ação da bomba de modo a evitar a cavitação. O controlo da pressão no extrator (Figura 8 a) é assegurado pelo FPR - *forward pressure regulator* - (Modelo: FPR-PL-400-80, ABJ Engineering PVT, India). O manómetro M.1 indica a pressão do acumulador e o manómetro M.2 indica a pressão de funcionamento do extrator. A pressão no interior do extrator é também indicada por um painel de controlo (Modelo: RH007, Rheonic, EUA), assim como a temperatura. A este painel de controlo (Figura 8 b) encontra-se ligado um termopar. O caudal mássico alimentado ao extrator é lido pelo medidor de caudal mássico (Modelo: RHM007, Rheonic, EUA) com uma capacidade máxima de funcionamento de 450 bar e 120° C. O extrator (E) cilíndrico ($1.6 \times 10^{-4} m^3$) encontra-se no interior de uma estufa (Modelo: 992, Scientific Engineering, África do Sul), o que permite a termostatização do processo de extração. Após a saída do CO₂ do extrator provoca-se uma perda de carga entre os 100 -140 bar de modo a precipitar a matéria orgânica extraída. Neste ponto ocorre uma expansão do CO₂, o que origina uma diminuição da temperatura acompanhada pelo congelamento da linha, o que se evita com uma camisa de aquecimento (Modelo: M2174/0295, Omega Engineering, Canadá), controlada por um termopar colocado no exterior da linha (*set point* 60°C). A perda de carga é provocada por uma válvula a jusante do extrator e controlada pelo manómetro M.3.

O extrato é recolhido no vaso de recolha à pressão atmosférica. Algum material que tenha precipitado na linha a jusante do extrator é recuperado por lavagem com etanol que se junta ao vaso de recolha.

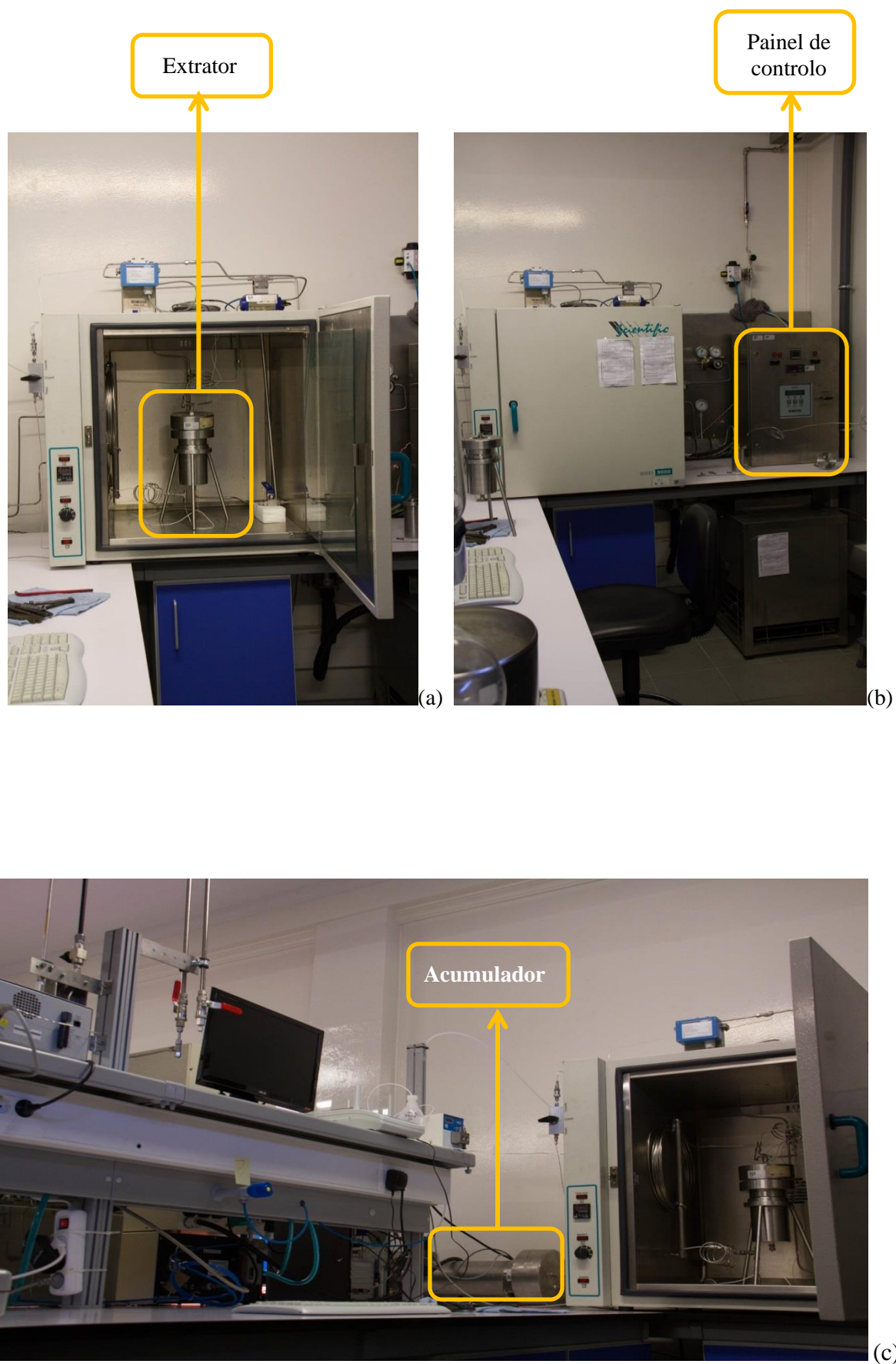


Figura 8 - a) Extrator supercrítico no interior da estufa b) Painel de controlo c) Aquisição de dados.

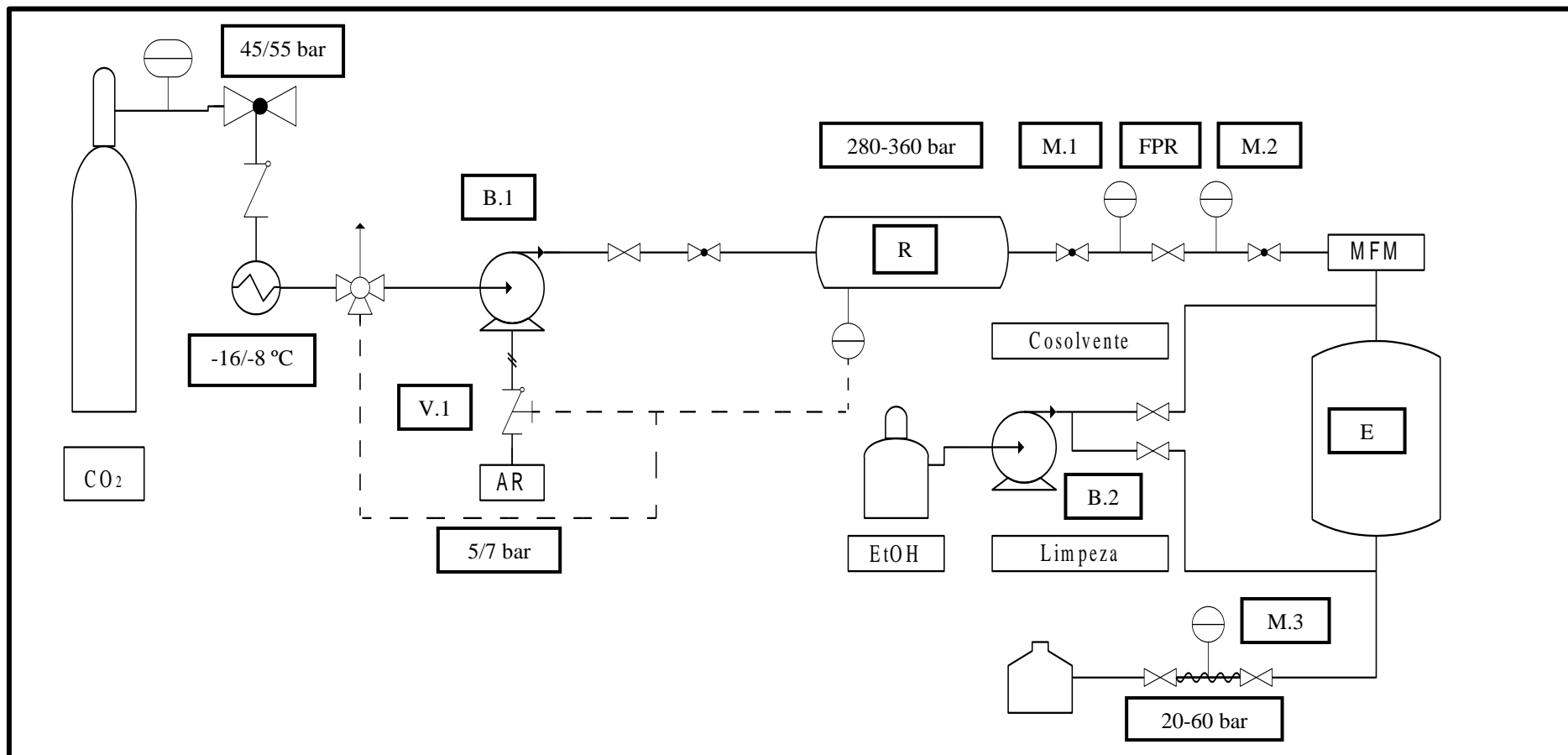


Figura 9 – Diagrama de fluxo da instalação de extração supercrítica

2.3. Cromatografia em fase gasosa (GC)

A cromatografia em fase gasosa foi a técnica usada para a identificação e quantificação dos ácidos gordos presentes no óleo do resíduo de café. A coluna de cromatografia em fase gasosa proporciona uma pressão de vapor que possibilita a eluição dos analitos num determinado tempo. A identificação dos compostos é feita por correspondência dos espectros dos picos obtidos com espectros presentes num banco de dados no caso de um detetor de massa (MS) ou recorrendo aos tempos de retenção dos picos comparando-os com os de padrões e/ou uma amostra conhecida no caso de detetores de ionização por chama (FID). Os tempos de retenção encontram-se relacionados com o caudal do gás de arraste, o comprimento da coluna e o valor do coeficiente de partição de cada analito. Do ponto de vista quantitativo, a base de trabalho é a área do pico cromatográfico, que, no intervalo de concentrações de resposta linear, é proporcional à quantidade do composto correspondente ao referido pico. A adição de um padrão interno de composição conhecida permite a análise quantitativa, após medição dos factores de resposta[79].

Transesterificação. Para a caracterização do óleo de café por cromatografia em fase gasosa recorreu-se à preparação dos ésteres metílicos de ácidos gordos (FAMES) por transesterificação com potássio. O procedimento compreende a preparação de um padrão interno de uma solução do éster heptadecanoato de metilo com uma concentração de 0.75 kg m^{-3} . Dissolveu-se 100 mg da amostra de óleo em 1 cm^3 de *n*-hexano e adicionou-se 0.2 cm^3 de uma solução de KOH/MeOH (2 M). Agitou-se a mistura num vórtex durante 30 s. Depois disso adicionou-se 2 cm^3 de uma solução saturada de cloreto de sódio à mistura e submeteu-se a uma centrifugação a 2000 r.p.m durante 5 min. Por fim retirou-se uma alíquota de $3 \mu\text{L}$ da fase orgânica usada na análise por cromatografia gasosa.

Equipamento. A alíquota foi analisada por cromatografia gasosa num Perkin Elmer Clarus 400 (EUA) equipado com uma coluna capilar de sílica DB-FFAP de $30 \text{ m} \times 0,32 \text{ mm}$, filme de revestimento de $0.25 \mu\text{m}$ e um detetor de ionização por chama (FID). Modo de injeção fracionada com um rácio de 20:1 (5 min). A temperatura de injeção foi de 245°C e o detetor encontrava-se a 250 K. A programação da temperatura envolveu três rampas: 75°C a 155°C a $15^\circ\text{C min}^{-1}$, de 155°C a 180°C a 3°C min^{-1} e de 180°C a 220°C a $40^\circ\text{C min}^{-1}$, e mantido isotermicamente durante 3 min. O caudal do gás de arraste, o hidrogénio, foi de $50 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Os compostos foram identificados por comparação dos tempos de retenção de FAMES comerciais numa mistura de C8-C24. Na Figura A. 1 (em anexo) apresenta-se um exemplo de um cromatograma obtido na análise por GC.

2.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Em inglês conhecida pela sigla HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*, trata-se de uma técnica de extrema relevância na análise da maioria dos compostos não passíveis de serem utilizados na cromatografia em fase gasosa dada a sua baixa volatilidade. Através da aplicação de pressões elevadas o solvente é forçado a passar através de um enchimento de partículas de adsorvente capaz de proporcionar separações de alta resolução [79].

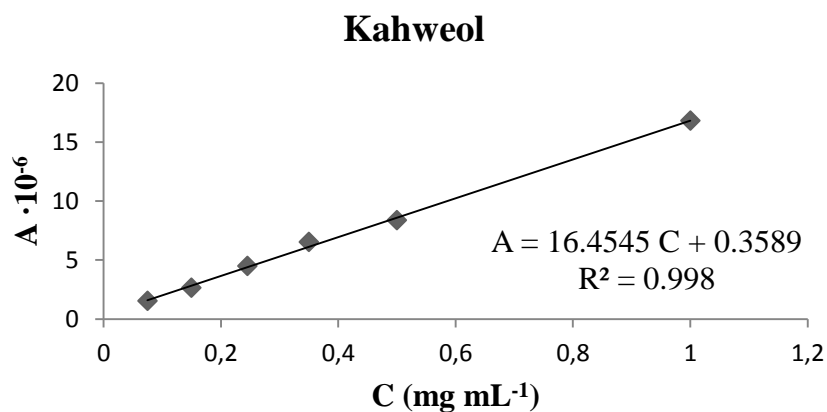
No procedimento seguido para a extração dos diterpenos da solução resultante da saponificação do óleo do resíduo de café substituiu-se o éter metilbútilico por éter dietílico e reduziu-se a quantidade da amostra em análise de 200 mg para 40 mg, dado que testes preliminares mostraram os mesmos resultados.

Saponificação e lavagem. A caracterização dos diterpenos totais (livres e esterificados) do óleo por HPLC foi feita recorrendo à saponificação dos diterpenos com hidróxido de potássio por adaptação do método proposto por Diaz *et al* [80]. Adicionou-se 2 mL de uma solução de hidróxido de potássio 2.5 M a 40 mg de amostra de óleo e aqueceu-se a 80° C durante 60 min. Posteriormente adicionou-se 2 mL de H₂O destilada e de éter dietílico e centrifugou-se durante 2 min a 3000 rpm, recolhendo a fase orgânica num outro tubo. Repetiu-se a adição do éter dietílico e a centrifugação por 2 vezes assim como a recolha da fase orgânica para o tubo. Adicionou-se 2 mL de H₂O destilada e centrifugou-se durante 2 min a 3000 rpm, e descartando-se a fase aquosa. Repetiu-se o procedimento da adição de água e a sua remoção duas vezes, e colocou-se a fase orgânica no Speed Vaccum. Diluiu-se em 5 mL o extrato remanescente numa solução de metanol – água (85:15, v/v) e retirou-se uma alíquota de 20 µL para a injeção no HPLC.

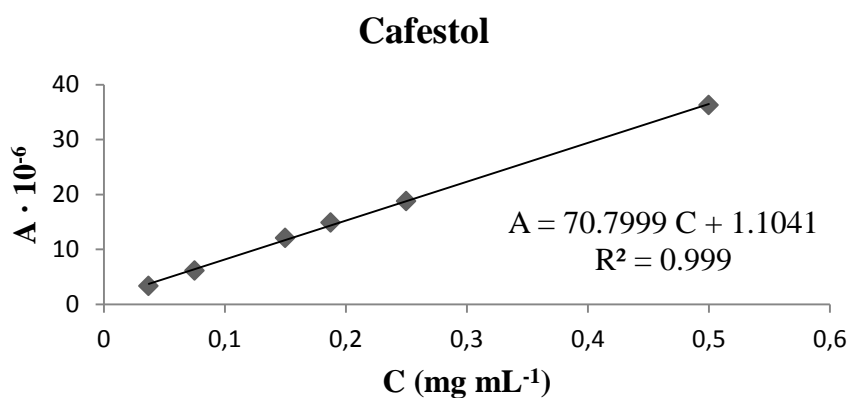
Equipamento. Para a identificação e quantificação dos diterpenos recorreu-se a um HPLC equipado com uma coluna Spherisorb S10 ODS2 (C18), 25 cm × 4.6 mm, com partículas de 10 µm, acoplado a um detetor de ultravioleta/visível (UV/Vis) – Gilson. O eluente da fase móvel é composto por uma mistura de MeOH/H₂O (85/15, v/v), cujo caudal foi de 0.7 mL · min⁻¹, analisando-se o analito a um comprimento de onda de 220 nm [81]. Na Figura A. 2 (em anexo) apresenta-se um exemplo de um cromatograma obtido por HPLC.

Retas de calibração. A quantificação dos diterpenos maioritários do óleo de resíduo de café foi feita recorrendo a retas de calibração individuais. Apresentam-se na Figura 10 as retas de calibração para os diterpenos kahweol, cafestol e 16-*O*-metilcafestol obtidas experimentalmente.

a)



b)



c)

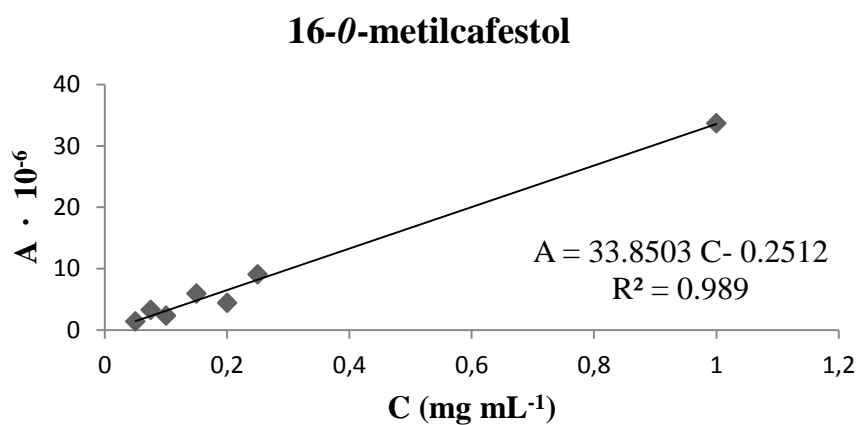


Figura 10 - Retas de calibração dos diterpenos maioritários do óleo de resíduo de café – a) Kahweol, b) Cafestol e c) 16 -*O*- metilcafestol. (A-área; C-concentração)



Tempos de retenção. Os tempos de retenção do kahweol, cafestol e 16-*O*-metilcafestol na coluna de HPLC foram determinados recorrendo ao uso de padrões puros dos referidos compostos, respectivamente: 10.47, 11.24 e 17.22 min. O aumento da pressão da coluna pode influenciar os tempos de retenção dos compostos, contudo, a proporção e a ordem dos tempos de eluição mantém-se. O aumento da pressão da coluna pode dever-se, por exemplo, à inexistência de uma pré-coluna, responsável pela filtração de impurezas presentes no analito ou à introdução de bolhas de ar presente na seringa de injeção.



3. Resultados e discussão

No presente capítulo apresentam-se os resultados obtidos nas experiências realizadas e discute-se os mesmos com base na informação disponível na literatura.

3.1.Extração em Soxhlet

Rendimento mássico. A extração em Soxhlet do resíduo de café com *n*-hexano apresentou um rendimento mássico médio em óleo de 15% em base seca. Valor semelhante foi reportado por Arya e Rao [20] cujo rendimento mássico foi de 13.4%. Contudo, dado os diferentes tipos de preparação da bebida de café ou a possível mistura de espécies pode encontrar-se valores inferiores ou superiores ao medido no presente trabalho. Por exemplo, Oliveira *et al* [82] publicou um rendimento mássico de 10 a 12% [82] enquanto que Couto *et al* [23] mencionaram um valor de 18.3%.

Ácidos Gordos. A análise por GC do óleo de café mostra uma composição média (m/m) de ácidos gordos em triacilglicerídeos de 68.48% . O ácido predominante é o ácido linoleico (C18:2) com uma percentagem mássica relativa de 44.67%, seguido pelo ácido palmitico (C16) 37.37%, pelo ácido oleico (C18:1) 8.31%, pelo ácido esteárico (C18) 7.07%, pelo ácido linolênico (C18:3) 1.42% e pelo ácido araquídico (C20:0) 1.16%.

3.2.Extração supercrítica

Nesta secção apresenta-se e discute-se o comportamento das curvas cumulativas de extração obtidas, comparando-as com dados presentes na literatura, assim como o perfil de extração em diterpenos das mesmas. Apresenta-se também o rendimento mássico em óleo e a composição em diterpenos do óleo de resíduo de café extraído.

3.2.1 Óleo do resíduo de café

Ácidos gordos. A análise por GC do óleo de café extraído a 190 bar/55°C mostra uma composição média (% , m/m) de ácidos gordos em triacilglicerídeos de 82.77%. A Tabela 8 mostra a composição relativa total de cada um dos ácidos analisados no extrato global. Ambos os resultados estão de acordo com o reportado na literatura por Couto *et al* e Cruz *et al* [23, 83]. Tal como se pode visualizar pela Figura 11, a composição do óleo extraído nos cinco extratos da curva cumulativa de extração é semelhante.

Tabela 8 - Perfil normalizado da composição global do óleo em ácidos gordos maioritários em triacilglicerídeos.

Ácido gordo	Soxhlet	190 bar/55°C
C16:0	37.37	37.48
C18:0	7.07	6.02
C18:1	8.31	9.53
C18:2	44.67	44.52
C18:3	1.42	0.99
C20:0	1.16	1.46

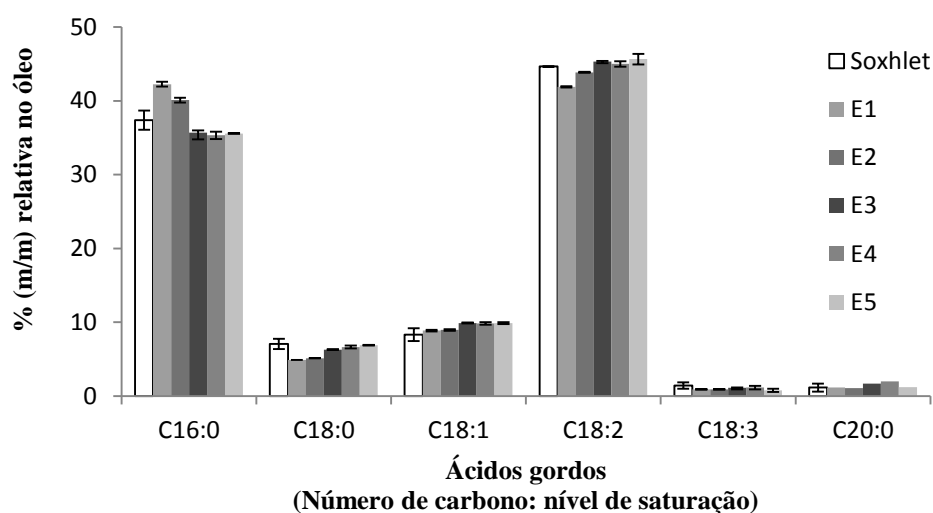


Figura 11 - Perfil dos ácidos gordos em triacilglicerídeos maioritários do óleo do resíduo de café obtidos ao longo da extração supercrítica a 190 bar/55°C

Curvas cumulativas de extração. A Figura 12 mostra as curvas cumulativas de extração supercrítica do óleo do resíduo de café (Figura 13) às pressões de 190 e 140 bar e às temperaturas 40 e 55°C. Pode observar-se que, mantendo um caudal mássico médio de $12 \text{ g} \cdot \text{min}^{-1}$, a pressões mais elevadas, e/ou temperaturas mais baixas, a quantidade mássica de CO_2 requerida para a extração da mesma quantidade óleo é menor devido ao aumento da densidade do CO_2 . Por exemplo, para a condição 190 bar/40°C obtém-se um rendimento de 10.54% consumindo 3.58 kg de CO_2 , enquanto que para as condições de 190 bar/55°C e 140 bar/55°C o rendimento obtido para o mesmo consumo (respetivamente de 3.54 e 3.36 kg de CO_2) é 7.50 e 1.4%, respetivamente. Realça-se assim que o rendimento mássico em óleo é cerca de 7,5 vezes superior operando a 190

bar e 40°C. Quanto à temperatura, pode observar-se que o seu aumento conduz a uma diminuição do rendimento em óleo. Passos *et al* [12] observaram um comportamento similar na extração supercrítica do óleo da grainha de uva. Todavia, o seu impacto é bem inferior ao incutido pela diminuição da pressão, pois para a pressão de 190 bar o aumento de 40 °C até 55°C conduz a um decréscimo de rendimento de 10.54% para 7.5%. Tal deve-se à diminuição da densidade do CO₂ que se repercute num menor poder solvente de CO₂ [23].

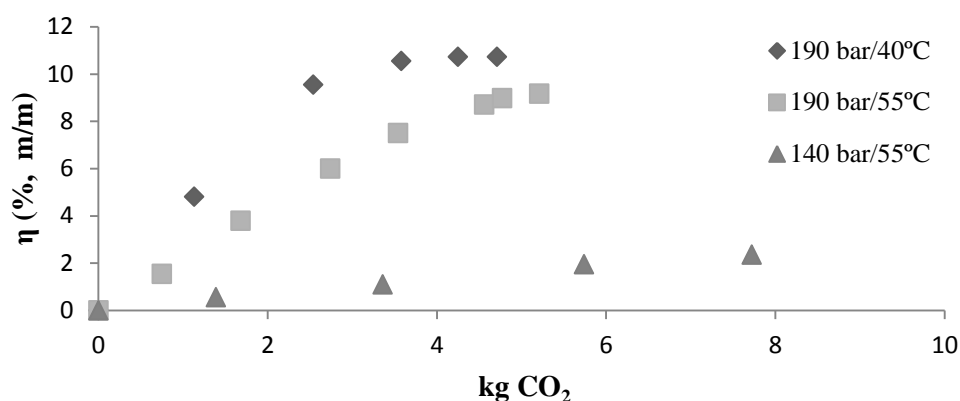


Figura 12 - Curvas cumulativas da extração supercrítica do óleo de café.

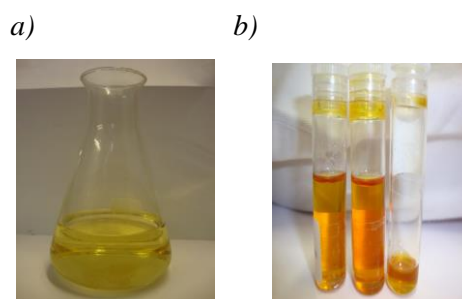


Figura 13 - a) Óleo do resíduo de café recolhido no vaso de extração e diluído em etanol. b) Óleo do resíduo de café após remoção do etanol.

Na Figura 14 apresenta-se uma comparação do comportamento das curvas obtidas no presente trabalho, 190 bar/40°C e 190 bar/55°C, com as obtidas por Couto *et al* [23] a 300 bar/50°C e 200 bar/50°C. Constata-se que o rendimento mássico absoluto em óleo obtido por Couto *et al* [23] é superior ao deste trabalho. Contudo, ao comparar-se o rácio entre o caudal de CO₂ e a massa de amostra repara-se que o de Couto *et al*, 30 kg_{CO2} · kg_{resíduo}⁻¹ · h⁻¹, é quase o triplo do aplicado no presente trabalho, 12 kg_{CO2} · kg_{resíduo}⁻¹ · h⁻¹. Um maior rácio m_{CO2}/m_{resíduo} permite que haja maior disponibilidade de CO₂ para a mesma quantidade de resíduo, podendo traduzir-se numa redução

das resistências externas à transferência de massa e, por conseguinte, uma cinética de extração mais rápida. Este facto, pode observar-se pelo declive mais acentuado das curvas de Couto *et al.* na fase inicial (ver Figura 14).

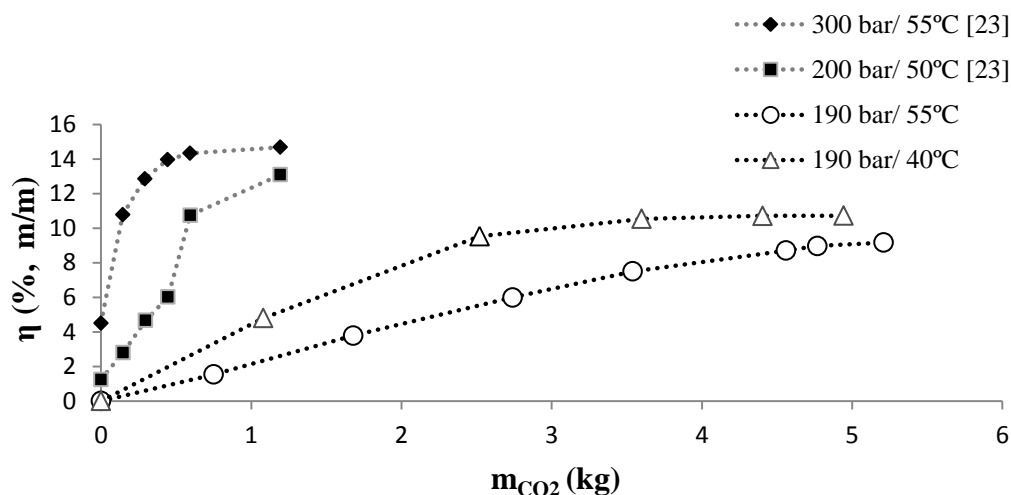


Figura 14 - Comparação de curvas de extração supercrítica do óleo de resíduo de café do presente trabalho e de Couto *et al* [23].

De modo a comparar-se as curvas de Couto *et al.*[23] e as do presente trabalho numa base similar, dividiu-se o rendimento mássico em óleo pelo respetivo valor de Soxhlet, resultando daí as curvas apresentadas na Figura 15.

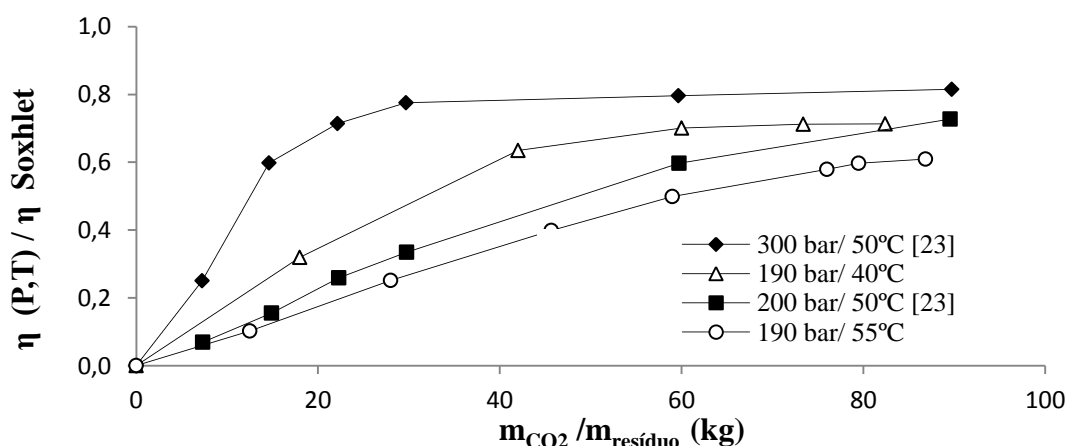


Figura 15 - Curvas cumulativas de extração normalizadas pelo valor do respetivo Soxhlet e massa de resíduo utilizado.

Pela Figura 15 pode concluir-se que, em termos de rendimento de extração face ao respetivo Soxhlet, a 190 bar/40°C o rendimento é superior ao obtido a 200 bar/50°C publicado por Couto *et al.* Todavia, repara-se que à condição 300 bar/50°C o rendimento máximo obtido é conseguido à

custa de um consumo de CO₂ inferior à metade do necessário a 190 bar/40°C. Tal é indicativo da enorme influência da densidade no rendimento em óleo da extração. Mostra-se, também, pela Figura 15, que as curvas normalizadas de 200 bar/50°C e 190 bar/55°C apresentam um comportamento bastante semelhante. Por outro lado, o aumento de 5°C, neste segundo exemplo, não compensa a queda dos 10 bar, isto porque o aumento da solubilidade devido ao aumento da pressão de vapor, não é contrabalançado pela perda da densidade, provocada pela diminuição da pressão e aumento da temperatura.

Solubilidade. A zona de comportamento linear da curva pode ser usada para determinar a solubilidade do óleo do resíduo de café no SC-CO₂ (Figura 16) de acordo com o referenciado na literatura. Nesta zona crê-se que impere a resistência externa à transferência de massa, enquanto que na região horizontal prevaleça a resistência interna à transferência de massa [84]. A solubilidade experimental pode ser determinada pelo declive da reta que relaciona o CO₂ gasto e a quantidade de óleo extraída, representando-se nas unidades g_{óleo}/kg_{CO2}. Compararam-se as solubilidades obtidas com o modelo empírico proposto por Chrastil [85], cuja densidade do CO₂ foi determinada pelo modelo de Pitzer *et al* [86]. Estas, às condições de 190 bar/40°C e 190 bar/55°C, apresentam um desvio relativo de -16.88% e -18.49%.

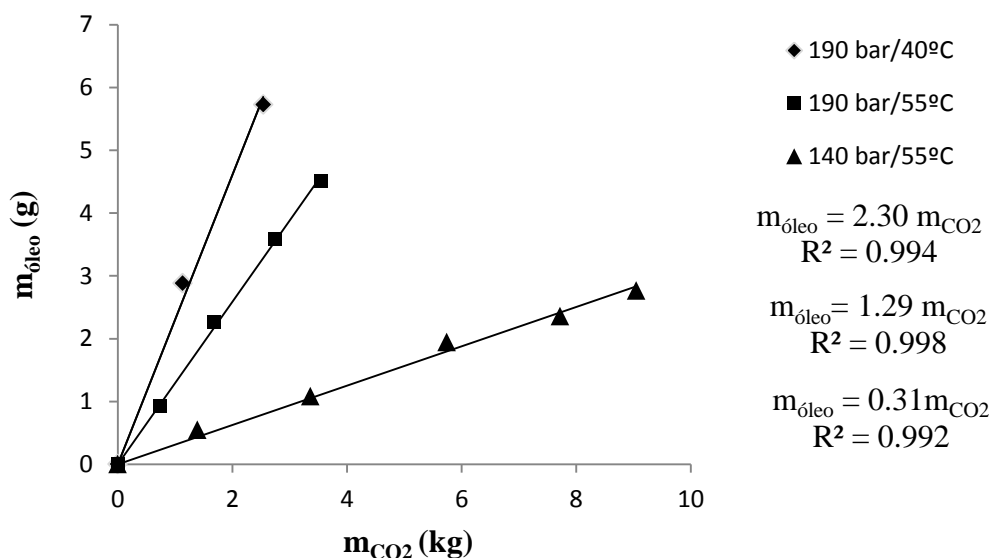


Figura 16 - Solubilidade experimental do óleo de café para diferentes condições.

3.2.2 Diterpenos do óleo de resíduo de café.

Curvas cumulativas de extração. Analisou-se para as curvas de 190 bar/55°C e 140 bar/55°C o perfil de diterpenos ao longo da extração e correspondente massa de CO₂. Observa-se pela Figura 17 que em ambos os casos, a massa total de diterpenos extraída por Soxhlet é superior à extraída

pelo SC-CO₂. Repara-se que a 190 bar o rendimento em diterpenos em relação ao resíduo é de 0.68% (m/m), enquanto que a 140 bar é 0.49%. O aumento de 50 bar, repercutido na densidade, reflectiu-se num aumento do rendimento em diterpenos de 28%.

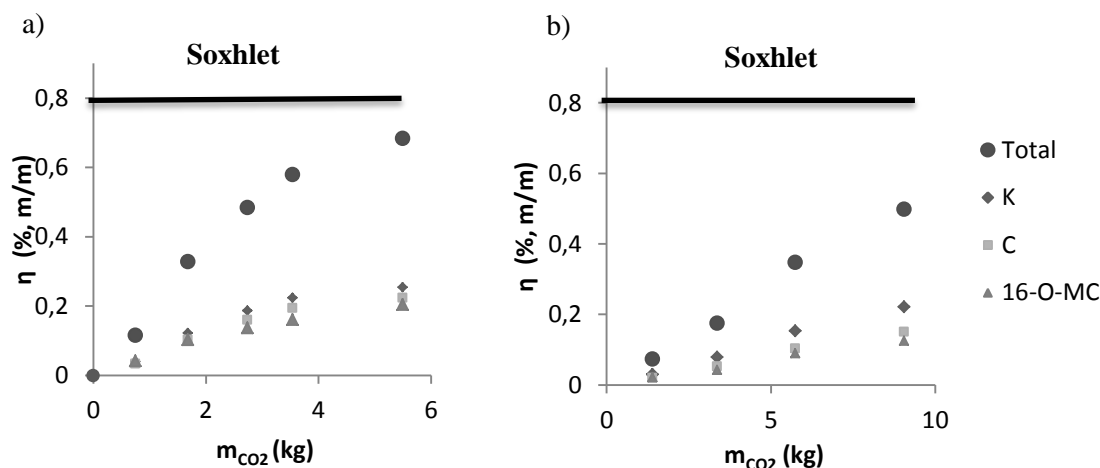


Figura 17 - Curvas cumulativas de extração dos diterpenos maioritários do óleo de resíduo de café. a) 190 bar/ 55°C e b) 140 bar/ 55°C. K –kahweol, C- cafestol e 16 - O - metilcafestol (mc).

Como se pode observar pelo perfil cumulativo de extração, a quantidade de diterpenos extraída não é proporcional (em toda a extração) ao consumo de CO₂ e respetivo tempo de extração. Pela Figura 18 é possível constatar-se que cerca de 84% do óleo, na condição de 190 bar/55°C, é extraído em aproximadamente cinco horas, sendo o restante 16% nas duas horas e meia seguintes. Pretende-se assim realçar que, do ponto de vista económico, poderá não ser rentável a continuação da extração para além deste ponto. Contudo, esta decisão deve ser acompanhada de um estudo económico de modo a averiguar o valor comercial do extrato e respetivos custos de produção/extração.

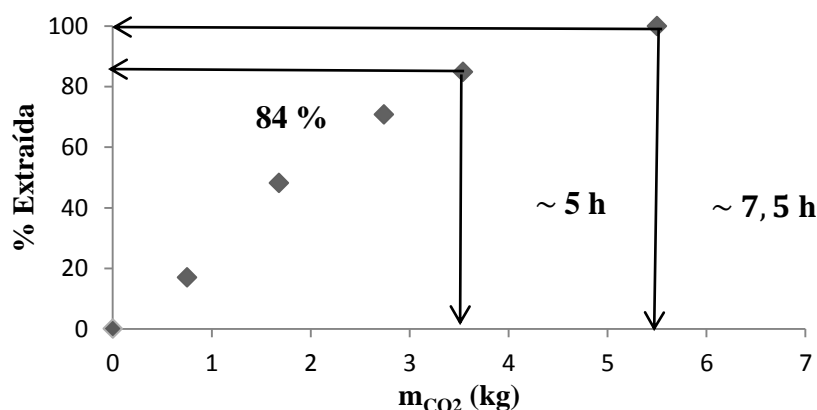


Figura 18 – Recuperação de diterpenos extraídos à condição de 190 bar/ 55°C.

Composição do óleo em diterpenos. A concentração de diterpenos no óleo de resíduo de café depende, em parte, das condições de operação a que o óleo foi extraído. Pela análise da Tabela 9,



observa-se que o óleo mais rico em diterpenos, cuja concentração é de $107.44 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{óleo}}$ foi extraído à condição de 140 bar e 55°C sem a presença de cossolvente, e o óleo menos rico, de concentração $42.47 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{óleo}}$, foi extraído à condição de 140 bar, 70°C e 2.5 % (m/m) de EtOH.

Tabela 9 - Composição do óleo e do resíduo de café em diterpenos.

<i>P</i> (bar)	<i>T</i> (°C)	EtOH (%, m/m)	<i>C</i>				η	
			(mg · g ⁻¹ _{óleo})			(% m/m _{óleo})	(%, m/m _{resíduo})	
			kahweol	cafestol	16 - <i>O</i> - mc ^a	Total	Total	Total
140	40	2.5	27.83	18.98	10.64	57.45	5.74	0.59
140	70	2.5	14.63	9.21	18.63	42.47	4.25	0.08
190	40	2.5	25.77	17.66	9.83	53.26	5.33	0.62
190	70	2.5	30.85	20.61	11.48	62.94	6.29	0.55
140	55	0	47.56	32.06	27.82	107.44	10.74	0.49
140	55	5	27.59	18.80	10.13	56.52	5.65	0.50
190	55	0	27.81	24.40	22.36	74.57	7.46	0.68
190	55	5	26.45	17.92	9.44	53.81	5.38	0.64
165	40	0	40.50	29.53	17.56	87.59	8.76	0.79
165	40	5	24.21	17.31	14.32	55.83	5.58	0.65
165	70	0	40.00	27.09	27.30	94.38	9.44	0.18
165	70	5	32.92	23.04	10.80	66.75	6.68	0.60
165	55	2.5	29.37	20.87	12.18	62.43	6.24	0.66
165	55	2.5	28.68	20.27	11.12	60.07	6.01	0.59
165	55	2.5	30.23	22.33	12.32	64.88	6.49	0.60
Soxhlet			29.49	16.67	6.53	52.69	5.27	0.79

^a16 -*O*- metilcafestol.

Todas as condições supercríticas extraíram um óleo mais rico em diterpenos do que o Soxhlet, $52.69 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{óleo}}$, à excepção, precisamente, do pior valor obtido com SC-CO₂, $42.47 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{óleo}}$. Embora se possa admitir uma certa variabilidade no resíduo, é notório que o SC-CO₂ extrai um óleo mais rico em diterpenos do que o Soxhlet. Relembre-se que o rendimento em óleo do Soxhlet é em todos os casos superior ao obtido por SC-CO₂, o que significa que embora o CO₂ extraia menos óleo, tal não se traduz na selectividade para com os diterpenos analisados. Assim, se o objectivo for apenas a extração do óleo sem interesse particular na concentração em diterpenos, em termos de rendimento, o Soxhlet é melhor opção que o SC-CO₂; já se o propósito da extração for um óleo rico em diterpenos, o oposto verifica-se.

Repare-se que a composição em diterpenos presente no óleo de café depende da proporção em que se encontram as diferentes espécies no lote de café. Na procura de informação relativa ao resíduo de café, a consulta no endereço electrónico oficial do fabricante dos lotes do café da máquina automática revelou a mistura das espécies *arabica* e *robusta*. Embora desconhecendo a proporção exata em que se encontravam, é razoável admitir uma forte presença da espécie *robusta*,

dados que na espécie *arabica* a presença do 16 -*O*- metilcafesol é insignificante ao contrário do sucedido no resíduo analisado.

3.3. Otimização da extração de óleo e diterpenos do resíduo de café

O objetivo da aplicação da metodologia de superfície de resposta no presente trabalho foi estudar a influência das condições operatórias – pressão, temperatura e conteúdo de cosolvente – no rendimento mássico em óleo e na concentração de diterpenos no óleo. O tratamento estatístico dos dados foi elaborado recorrendo ao programa STATISTICA (versão 5.1, StatSoft, Tulsa, EUA). Efectuou-se uma análise de variância ANOVA de modo a avaliar a significância dos parâmetros e suas interações a partir do teste de Fisher e da sua probabilidade associada. Realizou-se também testes *t-student* para os coeficientes de regressão em cada modelo. Apresentam-se em anexo os gráficos - valores previstos vs observados e resíduos – respeitantes aos pressupostos da análise de variância dos estudos efetuados.

3.3.1 Rendimento mássico em óleo.

A Tabela 10 mostra a codificação associada a cada nível da variável respeitante ao mapa de experiências realizadas de acordo com o planeamento de experiências, Tabela 6. A gama de pressões e temperatura são 140-190 bar e 40-70°C, sendo a variação do conteúdo do cosolvente (EtOH) 0-5% (m/m_{CO2}).

Os resultados experimentais obtidos no presente trabalho encontram-se na Tabela 11.

Tabela 10 – Codificação das variáveis do desenho Box-Behnken.

Variável		Nível correspondente		
		Inferior (-1)	Médio (0)	Superior (+1)
<i>P</i> (bar)	X_p	140	165	190
<i>T</i> (°C)	X_T	40	55	70
EtOH (% , m/m)	X_{EtOH}	0.0	2.5	5.0

Na Tabela 11 apresenta-se o rendimento mássico experimental em óleo obtido para cada uma das experiências realizadas de acordo com o desenho de Box-Behnken. Mostra-se, ainda, o valor previsto e erro associado do rendimento em óleo, quando calculado com o modelo reduzido representado pela Equação 7, posteriormente apresentada. Seguidamente, expõe-se os fundamentos



que suportam o dito modelo e as ilações a inferir acerca da influência das variáveis estudadas no objetivo relativo ao ponto em discussão.

Visualiza-se que o rendimento mássico em termos de óleo varia entre 1.99% e 11.97%, respectivamente nas experiências 2 e 8, aos quais correspondem os valores de previsão de 2.84% e 13.24%. Todos os pontos do modelo apresentam um erro relativo inferior a 10% à excepção do ponto 2.

Tabela 11 - Planeamento de experiências de acordo com o desenho de Box-Behnken e rendimento de óleo de café por massa de resíduo, η (% , m/m).

Experiência	P (bar)	T (°C)	EtOH	η_{exp} (% , m/m)	η_{reduzido} (% , m/m)	Erro%
1	140	40	2.5	10.21	10.58	3.58
2	140	70	2.5	1.99	2.84	30.06
3	190	40	2.5	11.66	11.91	2.10
4	190	70	2.5	8.74	9.46	7.69
5	140	55	0	4.61	5.12	9.98
6	140	55	5	8.79	9.27	5.17
7	190	55	0	9.16	9.10	-0.76
8	190	55	5	11.97	13.24	9.61
9	165	40	0	8.98	9.31	3.55
10	165	40	5	11.60	11.27	-2.93
11	165	70	0	1.93	2.02	4.44
12	165	70	5	8.94	8.36	-6.92
13	165	55	2.5	10.62	10.14	-4.70
14	165	55	2.5	10.52	10.14	-3.79
15	165	55	2.5	9.97	10.14	1.67

Diagrama de Pareto. Recorreu-se à representação estatística em Diagrama de Pareto, Figura 19, a fim de perceber a influência das variáveis estudadas no rendimento do óleo. A partir dele pode compreender-se quais os efeitos que contribuem para o benefício/prejuízo do rendimento da extração de óleo, identificando por ordem decrescente os referidos efeitos. O Diagrama de Pareto dada a proximidade dos valores absolutos dos efeitos estimados, permite concluir que o rendimento da extração em óleo de café resulta da combinação das variáveis pressão, temperatura e

cossolvente, sendo que cada uma delas individualmente contribui com um peso semelhante no benefício/prejuízo do rendimento conforme a cor da barra.

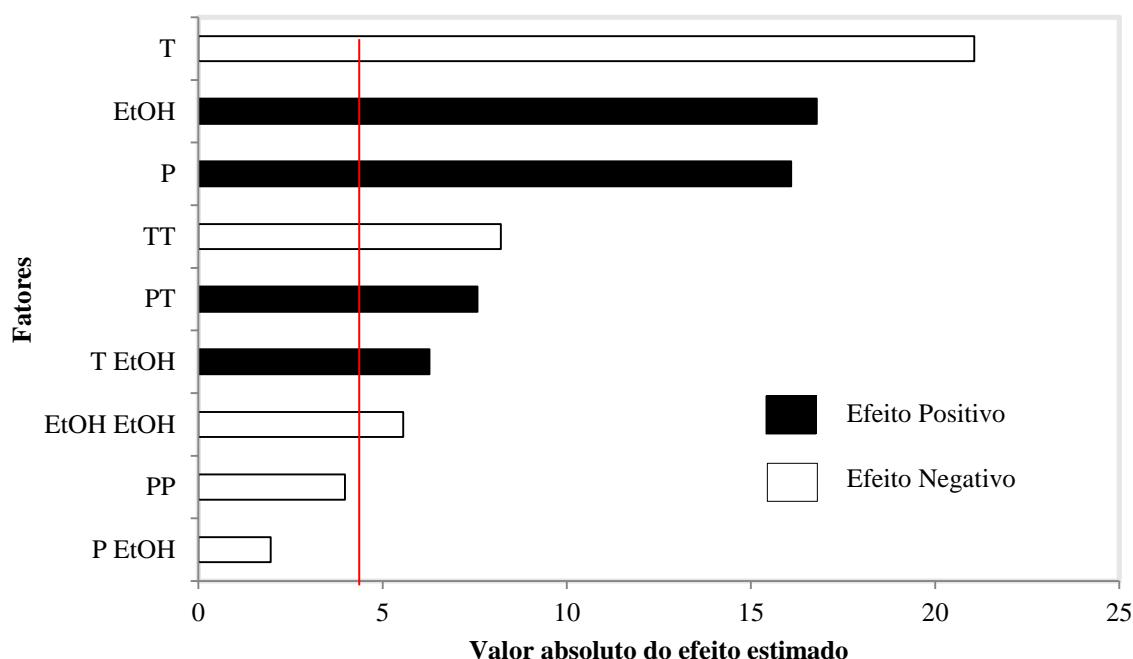


Figura 19 – Diagrama de Pareto ($p = 0,05$). Influência relativa das variáveis no rendimento da extração do óleo. Os valores não significativos ($p < 0,05$) não atingem a barra vertical.

Pela análise da Figura 19 verifica-se uma influência negativa da temperatura na extração do óleo de resíduo de café. É sabido que, a densidade do SC- CO_2 diminui com o aumento da temperatura (a pressão constante), o que se repercute num menor poder solvente, e por conseguinte, num rendimento mais baixo. Tal ocorrência já se havia observado na discussão das curvas cumulativas medidas no presente trabalho, reforçando assim a constatação feita a partir do Diagrama de Pareto. Quanto à pressão, era de esperar a sua influência positiva e acentuada no rendimento da extração. A presença de etanol conduz a um aumento do rendimento, a par com a pressão, na medida em que promove a extração de compostos polares.

Regressão quadrática. Da simplificação da Equação 1, representativa do modelo matemático de segunda ordem da resposta de superfície, resulta a Equação 6, equação final deste trabalho.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_P + \beta_2 X_T + \beta_3 X_{\text{EtOH}} + \beta_{11} X_P^2 + \beta_{22} X_T^2 + \beta_{33} X_{\text{EtOH}}^2 + \beta_{12} X_P X_T + \beta_{13} X_P X_{\text{EtOH}} + \beta_{23} X_T X_{\text{EtOH}}$$

Equação 6



Os coeficientes de regressão obtidos para a Equação 6 encontram-se na Tabela 12. Foram determinados estatisticamente com um nível de confiança de 95%. O bom ajuste do modelo aos dados experimentais pode explicar-se pela semelhança entre os coeficientes da correlação R^2 (0.990) e $R^2_{ajustado}$ (0.973).

Tabela 12 - Coeficientes da regressão para o modelo geral da resposta de superfície (Equação 6) relativo ao rendimento em óleo.

Variável	Coeficiente regressão Equação	p (t-Student)
	β_0	10.37
X_P	β_1	1.99125
$X_P X_P$	β_{11}	-0.725
X_T	β_2	-2.60625
$X_T X_T$	β_{22}	-1.495
X_{EtOH}	β_3	2.0775
$X_{EtOH} X_{EtOH}$	β_{33}	-1.0125
$X_P X_T$	β_{12}	1.325
$X_P X_{EtOH}$	β_{13}	-0.3425
$X_T X_{EtOH}$	β_{23}	1.0975
R^2	0.990	$R^2_{ajustado}$
		0.973

Os coeficientes a negrito são os que apresentam significância estatística ($p < 0,05$). Representam as situações em que se verificou a rejeição da hipótese nula no teste efetuado. Os coeficientes que não verificam o referido foram eliminados do modelo e calcularam-se os novos coeficientes (em anexo Tabela A.1), que a par com a descodificação dos parâmetros significativos da Equação 6, originam a Equação 7 ($R^2 = 0.974$ e $R^2_{ajustado} = 0.948$). O excelente ajuste do modelo reduzido aos pontos experimentais, evidenciado pela diferença irrelevante entre os coeficientes de correlação, é corroborado pela Figura A. 3(em anexo).

$$\eta_{\text{óleo}}(\%, m/m) = 20.034651 - 0.114595 P - 0.121893 T - 0.01299 EtOH - 0.006395 T^2 - 0.153076 EtOH^2 + 0.003533 P T + 0.029237 T EtOH$$

Equação 7

ANOVA. A análise de variância permite-nos avaliar a qualidade do ajuste do modelo aos dados experimentais, dado que compara a variação fruto da combinação das variáveis com os erros



aleatórios inerentes à medição das respostas. Tendo em conta que o planeamento de experiências usado implica a realização de réplicas do ponto central pode determinar-se o erro associado às repetições e assim dividi-lo em relação à falta de ajustamento. Pela Tabela 13 pode concluir-se que o erro associado à falta de ajustamento não é significativo dado que o seu valor da distribuição F (3.14) é inferior ao valor crítico de $F_{0.05,3,2}=19.16$ [75]; o que significa que a maior parte da variação observada é descrita pela equação representativa do modelo quadrático proposto. Quanto à significância dos restantes parâmetros e respectivas interações pode observar-se que esta coincide com o observado no Diagrama de Pareto e Tabela 12.

Tabela 13 - Análise ANOVA do rendimento do óleo do resíduo de café. Os valores a negrito representam os fatores significativos.

	SS	GL	MS	F	p
X_P	31.7206	1	31.72061	258.9438	0.00384
$X_P X_P$	1.9408	1	1.94077	15.843	0.05771
X_T	54.3403	1	54.34031	443.5944	0.002247
$X_T X_T$	8.2524	1	8.2524	67.3665	0.014522
X_{EtOH}	34.5281	1	34.52805	281.8616	0.003529
$X_{EtOH} X_{EtOH}$	3.7852	1	3.78519	30.8995	0.030872
$X_P X_T$	7.0225	1	7.0225	57.3265	0.017
$X_P X_{EtOH}$	0.4692	1	0.46922	3.8304	0.189463
$X_T X_{EtOH}$	4.818	1	4.81803	39.3308	0.024495
Falta de ajustamento	1.1544	3	0.38481	3.1413	0.250755
Erro puro	0.245	2	0.1225		
Total SS	146.655	14			
R^2	0.990		$R^2_{ajustado}$	0.973	

Resposta de superfície. A Figura 20 mostra as respostas de superfície obtidas para as temperaturas de 40° C e 70°C obtidas pela Equação 7 ($R^2 = 0.974$; $R^2_{ajustado} = 0,948$ e $R^2_{previsão} = 0.969$). Assim, a partir da Figura 20, pode concluir-se que a pressão e o uso de etanol favorecem o rendimento (valor positivo) e a temperatura contribui negativamente para este (valor negativo), isto é, o seu aumento não melhora o rendimento da extração. Pode inferir-se que o efeito da pressão de vapor (por aumento da temperatura) que contribuiria para a solubilidade do óleo no CO₂ não compensa o efeito da redução da densidade. As respostas de superfície obtidas estão de acordo com o dito em relação ao Diagrama de Pareto e aos coeficientes do modelo antes da decodificação, Tabela 12.

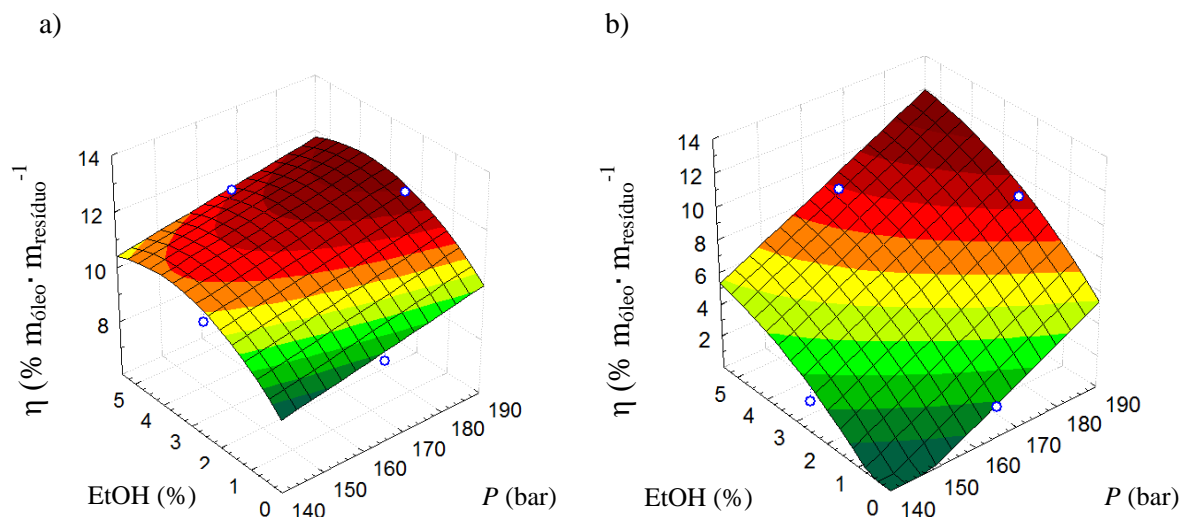


Figura 20 - Resposta de superfície do rendimento em óleo para as temperaturas de 40°C (a) e 70°C (b).

Diagrama de contorno. Os diagramas de contorno permitem-nos compreender através superfície 2D a influência da variação de duas das três variáveis que influenciam a extração, fixando o valor da terceira. Pela análise da Figura 21, pode inferir-se, tal como mostraram as ferramentas estatísticas anteriores, que o aumento da temperatura implica uma redução do rendimento em óleo. Repare-se que, por exemplo, para o rendimento da extração ser superior a 11% à temperatura de 40°C a pressão mínima necessária é 145 bar e a percentagem de etanol é de 3.5%, enquanto que a 70°C é, aproximadamente 177 bar e a percentagem de etanol necessária é superior a 5%. A par com o dito, note-se que à condição de 190 bar/40°C/2.5 % de etanol o rendimento em óleo é 11.66%, todavia o aumento de 30°C diminui o rendimento para 8.74%, ou seja um decréscimo de 2.92 %.

3.3.2 Rendimento em compostos diterpénicos

Os compostos diterpénicos quantificados foram o Cafestol, Kahweol e o 16-*O*-metilcafestol, esterificados e individuais, sendo aqui tratados em conjunto. Tal como no rendimento de óleo sujeitou-se o rendimento em diterpenos à RSM. Seguindo a abordagem estatística explicada no ponto referente ao rendimento da extração em óleo do resíduo de café, representa-se na Tabela 14 os coeficientes significativos e não significativos com um nível de confiança de 95%.

Regressão quadrática. A metodologia de cálculo dos coeficientes do modelo reduzido para o rendimento total em diterpenos foi semelhante à praticada no caso do rendimento em óleo, acima explicado. Eliminando os coeficientes não significativos (Tabela 14) do modelo geral, reotimizando os novos coeficientes (Tabela A. 2) e descodificando os parâmetros nas variáveis processuais em questão resulta a Equação 8 ($R^2 = 0.901$; $R^2_{\text{ajustado}} = 0.846$ e $R^2_{\text{previsão}} = 0.890$),

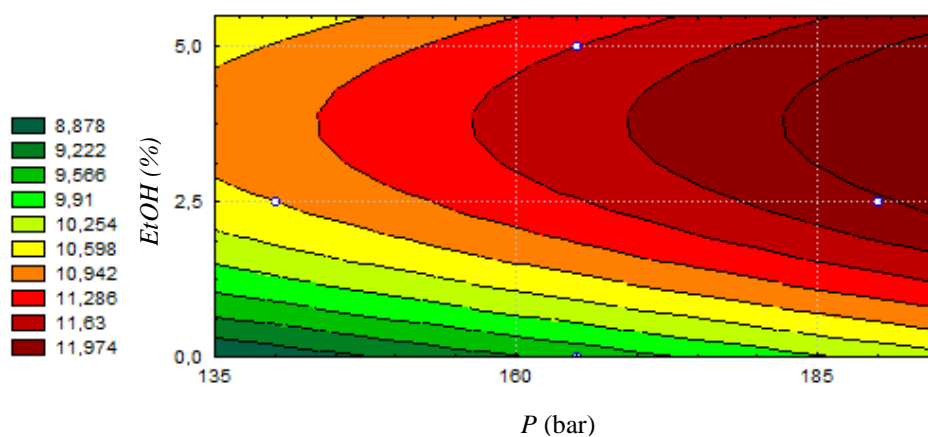
representativa do modelo reduzido referente ao rendimento em diterpenos. A Figura A.4 (em anexo) mostra qualidade boa do ajuste do modelo reduzido.

$$\eta_{diterpenos}(\%, m/m) = 2.385635 - 0.011616 P - 0.022920 T - 0.203096 EtOH + 0.000287 P T - 0.000396 T^2 + 0.003689 T EtOH$$

Equação 8

a)

η (% , $m_{\text{óleo}}/m_{\text{resíduo}}$)



b)

η (% , $m_{\text{óleo}}/m_{\text{resíduo}}$)

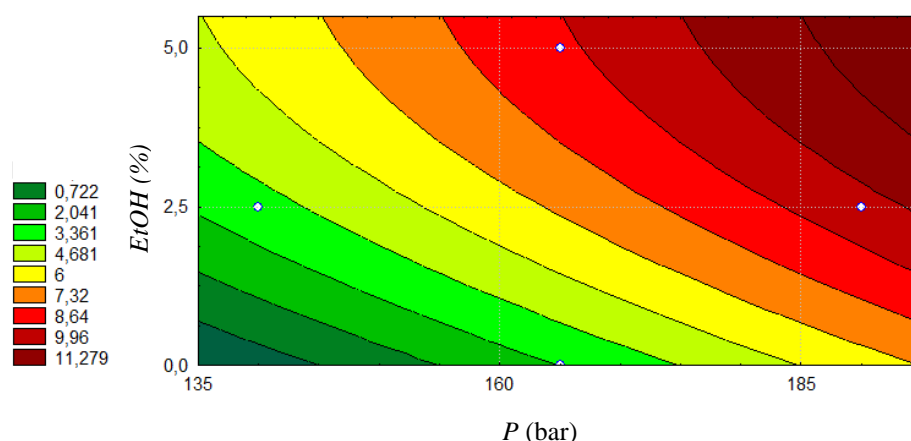


Figura 21 - Diagrama de contorno do rendimento da extração de óleo a 40°C (a) e 70°C (b).

**Tabela 14** - Coeficientes da regressão para o modelo geral da resposta de superfície do rendimento em diterpenos.

Variável	Coeficiente regressão Equação		<i>p</i> (t-student)
	β_0	0.617667	0.001386
X_P	β_1	0.104500	0.017721
$X_P X_P$	β_{11}	-0.065583	0.087234
X_T	β_2	-0.153625	0.008318
$X_T X_T$	β_{22}	-0.091833	0.047465
X_{EtOH}	β_3	0.029875	0.168243
$X_{EtOH} X_{EtOH}$	β_{33}	0.027667	0.314070
$X_P X_T$	β_{12}	0.107750	0.032580
$X_P X_{EtOH}$	β_{13}	-0.010250	0.658376
$X_T X_{EtOH}$	β_{23}	0.138500	0.020103
R^2	0.959	$R^2_{ajustado}$	0.884

Pela Tabela 14 verifica-se, tal como no rendimento da extração do óleo, que o rendimento em diterpenos é prejudicado pelo aumento da temperatura (sinal negativo do coeficiente linear) e favorecido pelo aumento da pressão (sinal positivo do coeficiente linear). Este balanço pressão e temperatura, tal como no rendimento da extração do óleo, encontra-se relacionado com a densidade do CO₂ e a referida pressão de vapor dos referidos compostos.

ANOVA. A análise realizada ao rendimento total de diterpenos no resíduo de café permite concluir a existência de um bom ajuste do modelo proposto na Equação 8 aos dados experimentais - Tabela 15. Isto, porque não existe falta de ajustamento e o valor da estatística de F dos termos significativos é superior ao valor crítico para os mesmos graus de liberdade. É de referir que, no modelo proposto pela Equação 8, o termo quadrático apresenta uma significância relativamente baixa face aos restantes termos. Porém, como a estatística de Fischer rejeita a hipótese dos termos nulos, não há razão para a não rejeição do termo. No entanto, pela Figura 22, pode observar-se a falta da curvatura característica de um modelo quadrático, indiciando assim a pouca contribuição do termo quadrático da temperatura para o modelo.

Tabela 15 - ANOVA do rendimento total de diterpenos no resíduo de café. Os valores a negrito representam os fatores significativos.

	SS	GL	MS	F	p
X_P	0.087362	1	0.08736	54.9331	0.017721
$X_P X_P$	0.01588	1	0.01588	9.9861	0.087235
X_T	0.188805	1	0.18881	118.7205	0.008318
$X_T X_T$	0.031139	1	0.031139	19.5799	0.047466
X_{EtOH}	0.00714	1	0.00714	4.4897	0.168243
$X_{EtOH} X_{EtOH}$	0.00282	1	0.00282	1.7771	0.31407
$X_P X_T$	0.04644	1	0.04644	29.2016	0.03258
$X_P X_{EtOH}$	0.00042	1	0.00042	0.2643	0.658377
$X_T X_{EtOH}$	0.076729	1	0.07673	48.2471	0.020104
Falta de ajustamento	0.01655	3	0.00551	3.4692	0.231763
Erro puro	0.00318	2	0.00159		
Total SS	0,47614	14			
R^2		0.958	$R^2_{ajustado}$		0.883

Resposta de superfície. Ao representar-se graficamente (Figura 22) o modelo reduzido da resposta de superfície e os pontos experimentais para as temperaturas de 40°C e 55°C, observa-se que o rendimento em diterpenos para a temperatura de 40°C é superior ao obtido à temperatura de 55°C, tal como já foi discutido.

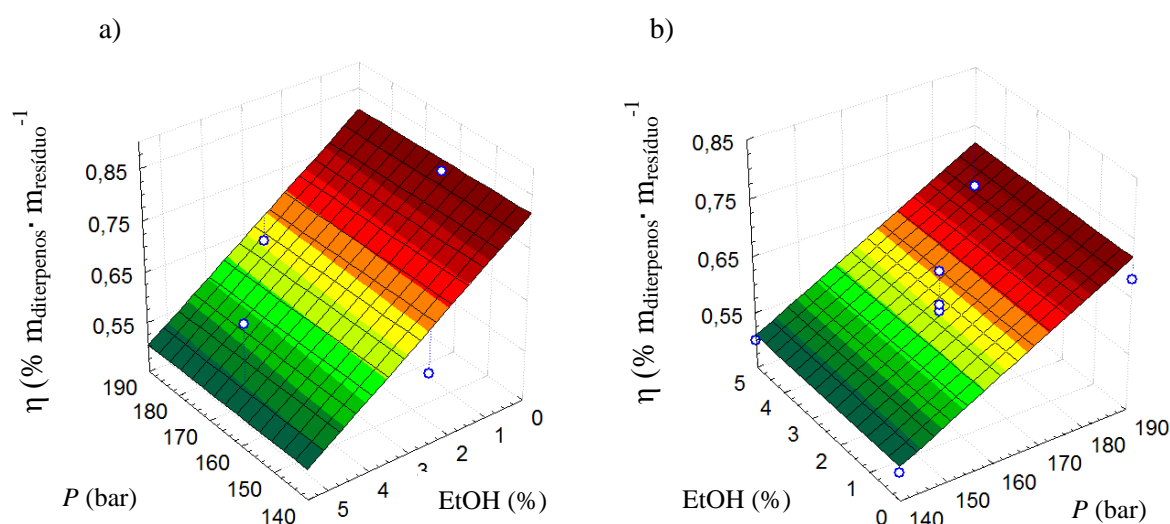


Figura 22 - Resposta de superfície do rendimento em diterpenos para as temperaturas de 40 ° C (a) e 55°C (b).

3.3.3 Concentração de diterpenos no óleo.

A concentração total de diterpenos no óleo foi determinada por HPLC. A fim de estudar-se a influência das variáveis em estudo procedeu-se à análise já descrita atrás.

Diagrama de Pareto. A partir da Figura 23 é possível inferir que o aumento da percentagem de cossolvente, diminui a concentração de diterpenos no óleo. Tendo em conta que a presença de EtOH não explica a redução da quantidade absoluta extraída de diterpenos, é razoável assumir que este é responsável pela extração de outros compostos que baixam a fração de diterpenos no óleo de resíduo de café. Por outro lado, nota-se que, contrariamente ao sucedido no rendimento em óleo, o aumento da quantidade de etanol diminui a concentração de diterpenos no óleo. Esta aparente perda na extração de diterpenos não implica que se extraia menos diterpenos, indica, sim, que o etanol auxilia a extração de outros compostos, como por exemplo compostos mais polares, que sem a sua presença não seriam extraídos, diminuindo desta forma a sua concentração no óleo.

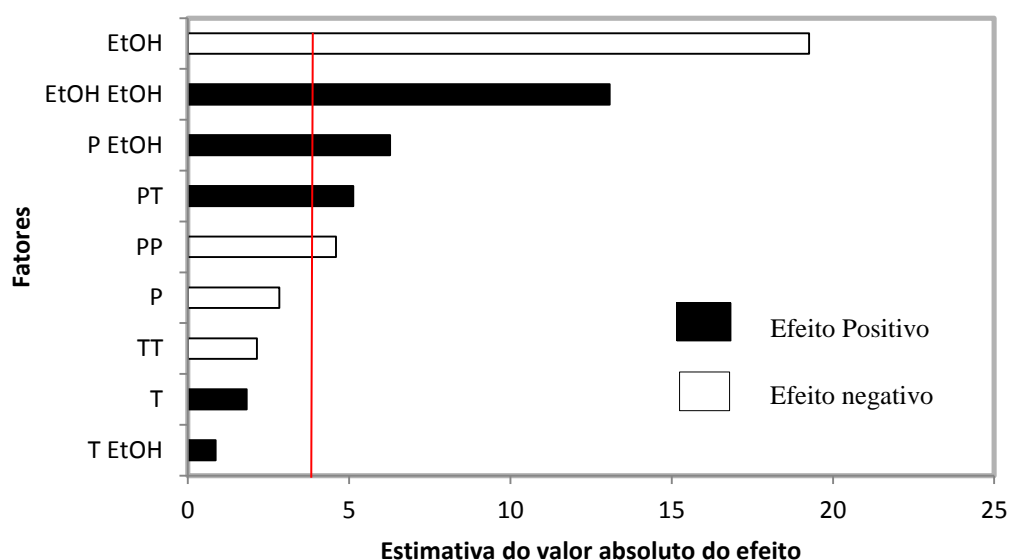


Figura 23 - Diagrama de Pareto relativo à concentração em diterpenos no óleo de resíduo de café. Os valores não significativos ($p < 0,05$) não atingem a barra vertical.

Regressão quadrática. A determinação dos coeficientes da regressão (modelo geral) para a concentração total dos diterpenos no óleo foi similar ao referido em pontos anteriores do presente trabalho e encontram-se representados na Tabela 16 e Tabela A. 3 (em anexo).

**Tabela 16** - Coeficientes da regressão para o modelo geral da resposta de superfície do rendimento em diterpenos.

Variável	Coeficiente regressão Equação		p (t-student)
	β_0	62.4567	0.000494
X_P	β_1	-2.4138	0.10494
$X_P X_P$	β_{11}	-5.7446	0.044344
X_T	β_2	1.5525	0.209441
$X_T X_T$	β_{22}	-2.6821	0.165392
X_{EtOH}	β_3	-16.3812	0.002684
$X_{EtOH} X_{EtOH}$	β_{33}	16.3704	0.005796
$X_P X_T$	β_{12}	6.165	0.036009
$X_P X_{EtOH}$	β_{13}	7.5425	0.024492
$X_T X_{EtOH}$	β_{23}	1.03	0.481975
R^2	0,898	$R^2_{ajustado}$	0,714

O modelo reduzido referente à concentração de diterpenos no óleo de café é dado pela Equação 9 ($R^2 = 0.875$; $R^2_{ajustado} = 0.806$ e $R^2_{previsão} = 0.871$). Note-se que os valores de R^2 são inferiores a 0,90; todavia, pela Figura A.5 (em anexo) pode visualizar-se que o modelo apresentado consegue prever, de forma razoável, o medido experimentalmente.

$$C \left(mg_{diterpenos} \cdot g_{\text{óleo}}^{-1} \right) = 51.46213 + 1.718733 P - 2.68732 T - 39.726 EtOH \\ - 0.00886 P^2 + 2.65523 EtOH^2 + 0.016424 P T + 0.12068 P EtOH$$

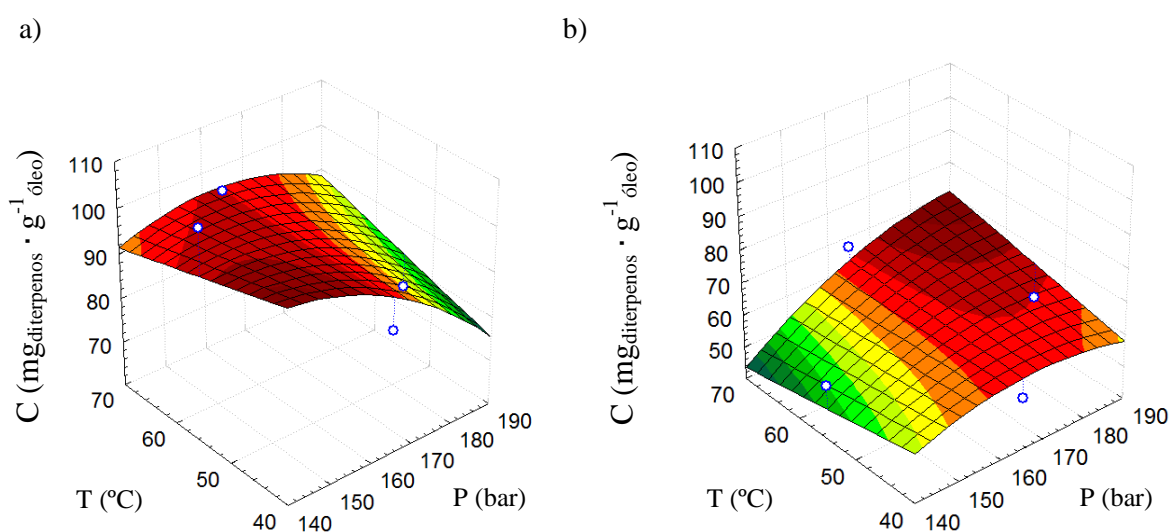
Equação 9

ANOVA. A análise de variância atribuiu significância à falta de ajustamento do modelo geral (Tabela A. 4, em anexo), o que, poderia revelar a falta de ajuste do modelo. Porém, eliminando os termos não significativos do modelo geral e realizando uma nova ANOVA, a falta de ajustamento do modelo reduzido Equação 9 não apresenta significância ($p > 0.05$) - Tabela 17.

Tabela 17 - ANOVA da concentração total de diterpenos no óleo de resíduo de café.

	SS	GL	MS	F	p
$X_P X_P$	113.926	1	113.926	19.6933	0.047212
X_{EtOH}	2146.763	1	2146.763	371.0891	0.002684
$X_{EtOH} X_{EtOH}$	1020.641	1	1020.641	176.4279	0.00562
$X_P X_T$	152.029	1	152.029	26.2797	0.036009
$X_P X_{EtOH}$	227.557	1	227.557	39.3355	0.024492
Falta de ajustamento	518.129	7	74.018	12.7948	0.074385
Erro puro	11.57	2	5.785		
Total SS	4245.397	14			
R^2		0.875	$R^2_{ajustado}$		0.805

Respostas de superfície e diagramas de contorno. A análise das respostas de superfície da concentração de diterpenos, Figura 24, corrobora o observado no diagrama de Pareto acerca da diminuição da quantidade de diterpenos quando se aumenta a percentagem de etanol.

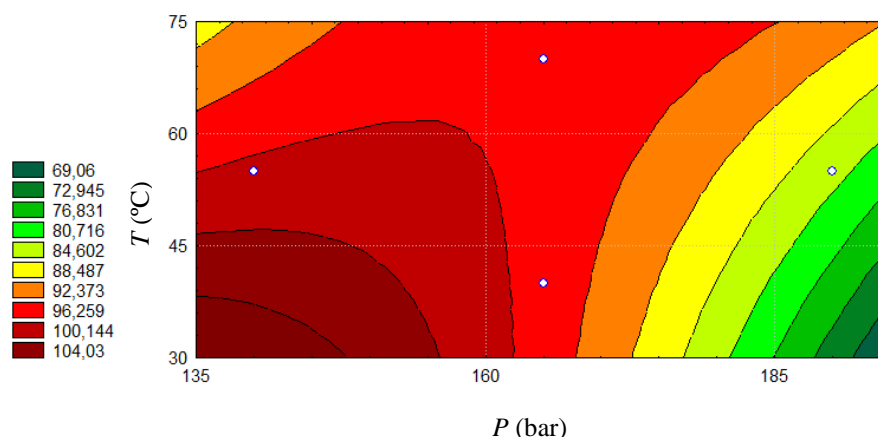

Figura 24 - Resposta de superfície da concentração de diterpenos no óleo de resíduo de café extraído com 0% (a) e 5% (b) de EtOH.

Note-se que o cossolvente tem um efeito inverso caso se esteja a analisar o rendimento da extração em óleo ou a concentração de diterpenos no óleo, isto porque embora a presença de etanol favoreça o rendimento mássico da extração, como se viu anteriormente, devido à solubilização de outros compostos, a sua extração acaba por baixar a fração mássica de diterpenos e portanto extrai-se um óleo menos rico em diterpenos. Confirma-se este facto se atendermos a que nos diagramas

de contorno, na zona dos pontos experimentais, a concentração de diterpenos diminui com o aumento de etanol. No entanto, repara-se que na ausência de cossolvente, a concentração de diterpenos aumenta com a diminuição da pressão e da temperatura, o que leva a inferir-se a relação inversa entre a densidade do SC-CO₂ e a concentração de diterpenos no óleo, assim como no rendimento mássico de diterpenos no resíduo de café.

a)

$C \text{ (mg}_{\text{diterpenos}} \cdot \text{g}^{-1} \text{ óleo)}$



b)

$C \text{ (mg}_{\text{diterpenos}} \cdot \text{g}^{-1} \text{ óleo)}$

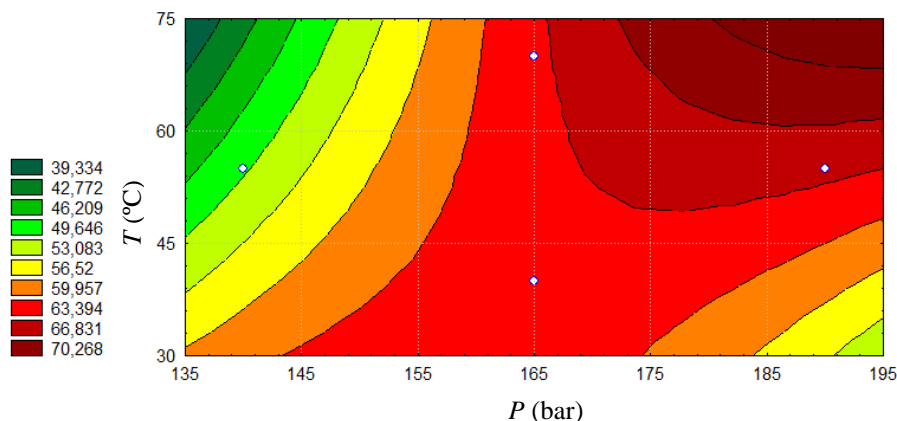


Figura 25 - Diagramas de contorno da concentração de diterpenos no óleo de resíduo de café operando com 0% (a) e 5% (b) de EtOH.



3.4 Considerações finais

Numa perspectiva da comercialização do óleo de resíduo de café e face à informação obtida pela metodologia de resposta de superfície, é importante definir qual seria o propósito da mesma, se apenas a extração do óleo ou o interesse da riqueza neste em diterpenos. Nesse sentido determinaram-se as condições ótimas de extração para a gama das variáveis estudadas, sendo estas as que maximizam a resposta dos modelos reduzidos apresentados. O rendimento mássico em óleo é ótimo para a condição de 190 bar, 55°C e 5% de etanol sendo o valor de 13.28 % e para o rendimento em diterpenos é 190 bar, 40°C, 0% EtOH sendo o valor 0.81%. A concentração ótima em diterpenos no óleo é de $102.90 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{óleo}}$, obtida à condição de 140 bar, 40°C e 0% de etanol. Verifica-se que o aumento da densidade do CO_2 e a presença de etanol favorece o rendimento em óleo. Por outro lado, observa-se uma relação inversa entre a densidade do CO_2 e a presença de EtOH na concentração de diterpenos no óleo. É, portanto, claro, que a escolha das condições supercríticas deverá reflectir o propósito da extração.



4. Conclusões e sugestões de trabalho futuro

4.1 Conclusões

O presente trabalho visou o estudo da otimização da coextração supercrítica do óleo de resíduo de café e dos compostos diterpênicos maioritários, 16-*O*-metilcafestol, Kahweol e Cafestol.

Realizaram-se curvas cumulativas de extração do óleo de resíduo de café nas condições de 190 bar/40°C, 190 bar/ 55°C e 140 bar/55°C sem cosolvente. Observou-se que o aumento de temperatura influencia negativamente o rendimento devido à diminuição da densidade do SC-CO₂, que se traduz num menor poder solvente. As curvas cumulativas apresentaram um rendimento em óleo de 10.72% (m/m), 9.16% (m/m) e 2.35 % (m/m), respectivamente, valores inferiores ao obtido por Soxhlet, 15%.

Por cromatografia em fase gasosa analisou-se o perfil dos ácidos gordos presentes nos triacilglicerídeos da extração supercrítica a 190 bar/55°C e do Soxhlet, família de compostos maioritária no óleo de café. Não se registou nenhuma diferença significativa a nível dos ácidos maioritários – ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) - entre o óleo extraído via Soxhlet e em CO₂ supercrítico. A quantificação dos compostos diterpênicos principais foi feita por HPLC.

Recorrendo à metodologia de resposta de superfície optimizou-se o rendimento mássico em óleo e a sua concentração nos compostos diterpênicos principais. O estudo de optimização foi conduzido na gama de 140-160 bar, 40-70°C e 0-5% de etanol. O planeamento das experiências seguiu o desenho de Box-Behnken. De modo geral, todos os modelos reduzidos apresentados correlacionam bem os dados experimentais obtidos.

Na gama de condições estudadas, o rendimento ótimo em óleo é de 13.28% obtido a 190 bar/55°C/5% EtOH, o rendimento em diterpenos é de 0.81 % obtido a 190 bar/40°C/0% EtOH e a concentração mássica ótima em diterpenos é de 102.9 mg · g⁻¹_{óleo} a 140 bar/40°C/0 % etanol. Concluiu-se a existência de uma relação inversa entre a densidade do SC-CO₂ e a riqueza do óleo em diterpenos, isto é, a diminuição da densidade do SC-CO₂ favorece a seletividade em compostos diterpênicos. Porém, tal não implica uma diferença significativa da extração de diterpenos a densidades mais elevadas, significa sim, que nestas extrai-se outros compostos que baixam a fração mássica de diterpenos no óleo. Quanto à presença de etanol, como cosolvente, verifica-se que este tem um efeito positivo no rendimento em óleo, embora diminuía a concentração de diterpenos no óleo. Torna-se assim claro, que a escolha das condições de operação supercríticas dependerá do propósito da extração, óleo rico em diterpenos ou apenas massa de óleo.



4.2 Sugestões de trabalho futuro

O presente trabalho contribuiu para o estudo da extração supercrítica do óleo do resíduo de café numa gama de pressões de 140 a 190 bar e temperatura entre 40°C e 70°C, com ou sem a presença de cossolvente. Caracterizou-se a sua composição em relação aos três principais diterpenos presentes no café, cafestol, kahweol e 16-*O*- metilcafestol e comparou-se a mesma com o obtido por Soxhlet.

No seguimento deste trabalho, seria interessante o estudo da actividade antioxidante, do óleo nomeadamente do seu perfil ao longo da extração e a influência da conjugação das variáveis pressão, temperatura e uso de cossolvente sobre a mesma. No que diz respeito ao comportamento de extração, seria importante averiguar o ajuste das curvas cumulativas de extração com modelos já existentes de forma a averiguar os mecanismos dominantes do processo. Tendo em conta o propósito da extração - rendimento em óleo, rendimento em diterpenos e a concentração de diterpenos no óleo - seria útil a medição das curvas cumulativas para as condições que o maximizam.

5. Bibliografia

1. Silva, J.A., N. Borges, A. Santos, and A. Alves, *Method Validation for Cafestol and Kahweol Quantification in Coffee Brews by HPLC-DAD*. Food Analytical Methods, 2012. **5**(6): p. 1404-1410.
2. Scharf, G., S. Prustomersky, and W.W. Huber, *Elevation of glutathione levels by coffee components and its potential mechanisms*. Biological Reactive Intermediates Vi, 2001. **500**: p. 535-539.
3. Cavin, C., D. Holzhaeuser, G. Scharf, A. Constable, W.W. Huber, and B. Schilter, *Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity*. Food and Chemical Toxicology, 2002. **40**(8): p. 1155-1163.
4. Follier, F., J. and S. Plessis, *Use of coffee beans oil as a sun filter*, U. Patent, Editor 1988.
5. Al-Hamamre, Z., S. Foerster, F. Hartmann, M. Kroger, and M. Kaltschmitt, *Oil extracted from spent coffee grounds as a renewable source for fatty acid methyl ester manufacturing*. Fuel, 2012. **96**(1): p. 70-76.
6. Tokimoto, T., N. Kawasaki, T. Nakamura, J. Akutagawa, and S. Tanada, *Removal of lead ions in drinking water by coffee grounds as vegetable biomass*. Journal of Colloid and Interface Science, 2005. **281**(1): p. 56-61.
7. Simoes, J., P. Madureira, F.M. Nunes, M.D. Domingues, M. Vilanova, and M.A. Coimbra, *Immunostimulatory properties of coffee mannans*. Molecular Nutrition & Food Research, 2009. **53**(8): p. 1036-1043.
8. Silva, M.A., S.A. Nebra, M.J.M. Silva, and C.G. Sanchez, *The use of biomass residues in the Brazilian soluble coffee industry*. Biomass & Bioenergy, 1998. **14**(5-6): p. 457-467.
9. Scalbert, A., I.T. Johnson, and M. Saltmarsh, *Polyphenols: antioxidants and beyond*. American Journal of Clinical Nutrition, 2005. **81**(1): p. 215s-217s.
10. RiceEvans, C.A., J. Miller, and G. Paganga, *Antioxidant properties of phenolic compounds*. Trends in Plant Science, 1997. **2**(4): p. 152-159.
11. Martins, S., C.N. Aguilar, I. de la Garza-Rodriguez, S.I. Mussatto, and J.A. Teixeira, *Kinetic study of nordihydroguaiaretic acid recovery from Larrea tridentata by microwave-assisted extraction*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2010. **85**(8): p. 1142-1147.
12. Passos, C.P., R.M. Silva, F.A. Da Silva, M.A. Coimbra, and C.M. Silva, *Supercritical fluid extraction of grape seed (Vitis vinifera L.) oil. Effect of the operating conditions upon oil composition and antioxidant capacity*. Chemical Engineering Journal, 2010. **160**(2): p. 634-640.

13. Reverchon, E. and I. De Marco, *Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter*. Journal of Supercritical Fluids, 2006. **38**(2): p. 146-166.
14. Belitz, H. and W. Grosch, *Food Chemistry*. Second ed1999: Springer.
15. Ferrari, M., F. Ravera, E. De Angelis, F.S. Liverani, and L. Navarini, *Interfacial properties of coffee oils*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2010. **365**(1-3): p. 79-82.
16. Daglia, M., A. Papetti, P. Grisoli, C. Aceti, V. Spini, C. Dacarro, and G. Gazzani, *Isolation, identification, and quantification of roasted coffee antibacterial compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(25): p. 10208-10213.
17. Daglia, M., R. Tarsi, A. Papetti, P. Grisoli, C. Dacarro, C. Pruzzo, and G. Gazzani, *Antiadhesive effect of green and roasted coffee on Streptococcus mutans' adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(5): p. 1225-1229.
18. Almeida, A.A.P., A. Farah, D.A.M. Silva, E.A. Nunan, and M.B.A. Gloria, *Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(23): p. 8738-8743.
19. Anese, M., T. De Pilli, R. Massini, and C.R. Lerici, *Oxidative stability of the lipid fraction in roasted coffee*. Italian Journal of Food Science, 2000. **12**(4): p. 457-462.
20. Arya, M. and L.J.M. Rao, *An impression of coffee carbohydrates*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2007. **47**(1): p. 51-67.
21. Spiller, G (org)., *Caffeine*. Califórnia, 1998, CRC press.
22. do Canto, J.L., F.M.G. Coelho, R. Noce, C.C. Machado, J.L.P. de Rezende, L.M. Mendes, and J.M. de Oliveira, *Social Aspects of Subsidized Forest Plantations in the State of Espirito Santo, Brazil*. Cerne, 2009. **15**(2): p. 123-132.
23. Couto, R.M., J. Fernandes, M.D.R.G. da Silva, and P.C. Simoes, *Supercritical fluid extraction of lipids from spent coffee grounds*. Journal of Supercritical Fluids, 2009. **51**(2): p. 159-166.
24. Speer, K. and I. Kölling-Speer, *The lipid fraction of the coffee bean*. Brazilian Journal of Plant Physiology, 2006. **18**: p. 201-216.
25. Bonita, J.S., M. Mandarano, D. Shuta, and J. Vinson, *Coffee and cardiovascular disease: In vitro, cellular, animal, and human studies*. Pharmacological Research, 2007. **55**(3): p. 187-198.
26. Kurzrock, R., Z. Estrov, S. Ku, M. Leonard, and M. Talpaz, *Interleukin-1 increases expression of the LYT-10 (NF kappa B2) proto-oncogene transcription factor in renal cell carcinoma lines*. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1998. **131**(3): p. 261-268.



27. Kurzrock, T. and K. Speer, *Diterpenes and diterpene esters in coffee*. Food Reviews International, 2001. **17**(4): p. 433-450.
28. Araújo, J.M.A. and D. Sandi, *Extraction of coffee diterpenes and coffee oil using supercritical carbon dioxide*. Food Chemistry, 2007. **101**(3): p. 1087-1094.
29. Ratnayake, W.M.N., R. Hollywood, E. Ogrady, and B. Stavric, *Lipid-Content and Composition of Coffee Brews Prepared by Different Methods*. Food and Chemical Toxicology, 1993. **31**(4): p. 263-269.
30. Kölling-Speer, I., S. Strohschneider, and K. Speer, *Determination of Free Diterpenes in Green and Roasted Coffees*. Journal of High Resolution Chromatography, 1999. **22**(1): p. 43-46.
31. Brunner, G., *Supercritical fluids: technology and application to food processing*. Journal of Food Engineering, 2005. **67**(1-2): p. 21-33.
32. Theyssen, N. [cited 2013 20 Fevereiro]; Transformation of coexisting gaseous and liquid into supercritical carbon dioxide by heating]. Available from: <http://www.kofo.mpg.de/en/research/service-departements/technical-laboratories>.
33. Arai, Y., T. Sako, and Y. Takebayashi, *Supercritical fluid : Molecular interactions, physical properties and new applications*, 2001, Springer.
34. Hasan, N. and B. Farouk, *Buoyancy driven convection in near-critical and supercritical fluids*. International Journal of Heat and Mass Transfer, 2012. **55**(15-16): p. 4207-4216.
35. Mendiola, J.A., M. Herrero, A. Cifuentes, and E. Ibanez, *Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications*. Journal of Chromatography A, 2007. **1152**(1-2): p. 234-246.
36. Passos, C.P., M.A. Coimbra, F.A. Da Silva, and C.M. Silva, *Modelling the supercritical fluid extraction of edible oils and analysis of the effect of enzymatic pre-treatments of seed upon model parameters*. Chemical Engineering Research & Design, 2011. **89**(7A): p. 1118-1125.
37. Ramsey, E., Q.B. Sun, Z.Q. Zhang, C.M. Zhang, and W. Gou, *Mini-Review: Green sustainable processes using supercritical fluid carbon dioxide*. Journal of Environmental Sciences-China, 2009. **21**(6): p. 720-726.
38. Pasquali, I. and R. Bettini, *Are pharmaceuticals really going supercritical?* International Journal of Pharmaceutics, 2008. **364**(2): p. 176-187.
39. Ashraf-Khorassani, M., L.T. Taylor, K.C. Waterman, P. Narayan, D.R. Brannegan, and G.L. Reid, *Purification of pharmaceutical excipients with supercritical fluid extraction*. Pharmaceutical Development and Technology, 2005. **10**(4): p. 507-516.



40. Izake, E.L., *Chiral discrimination and enantioselective analysis of drugs: An overview*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007. **96**(7): p. 1659-1676.
41. Zosel, K., *Process for recovering caffeine*, Patente dos EUA 19740423, 23 de Abril de 1974.
42. Gracia, I., J.F. Rodriguez, A. de Lucas, M.F. Fernandez-Ronco, and M.T. Garcia, *Optimization of supercritical CO₂ process for the concentration of tocopherol, carotenoids and chlorophylls from residual olive husk*. Journal of Supercritical Fluids, 2011. **59**: p. 72-77.
43. Andrade, K.S., R.T. Goncalvez, M. Maraschin, R.M. Ribeiro-do-Valle, J. Martinez, and S.R.S. Ferreira, *Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition*. Talanta, 2012. **88**: p. 544-552.
44. Felföldi-Gáva, A., S. Szarka, B. Simándi, B. Blazics, B. Simon, and Á. Kéry, *Supercritical fluid extraction of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.* Journal of Supercritical Fluids.
45. Grevenstuk, T., S. Goncalves, J.M.F. Nogueira, M.G. Bernardo-Gil, and A. Romano, *Recovery of high purity plumbagin from *Drosera intermedia**. Industrial Crops and Products, 2012. **35**(1): p. 257-260.
46. Martin, L., A.M. Mainar, A. Gonzalez-Coloma, J. Burillo, and J.S. Urieta, *Supercritical fluid extraction of wormwood (*Artemisia absinthium* L.)*. Journal of Supercritical Fluids, 2011. **56**(1): p. 64-71.
47. Moura, P.M., G.H.C. Prado, M.A.A. Meireles, and C.G. Pereira, *Supercritical fluid extraction from guava (*Psidium guajava*) leaves: Global yield, composition and kinetic data*. Journal of Supercritical Fluids, 2012. **62**: p. 116-122.
48. Uquiche, E., E. Huerta, A. Sandoval, and J.M. del Valle, *Effect of boldo (*Peumus boldus* M.) pretreatment on kinetics of supercritical CO₂ extraction of essential oil*. Journal of Food Engineering, 2012. **109**(2): p. 230-237.
49. Alexandre, A.M.R.C., A.M.A. Dias, I.J. Seabra, A.A.T.G. Portugal, H.C. de Sousa, and M.E.M. Braga, *Biodiesel obtained from supercritical carbon dioxide oil of *Cynara cardunculus* L.* Journal of Supercritical Fluids, 2012. **68**: p. 52-63.
50. Wang, Y.F., D. Sun, H. Chen, L.S. Qian, and P. Xu, *Fatty Acid Composition and Antioxidant Activity of Tea (*Camellia sinensis* L.) Seed Oil Extracted by Optimized Supercritical Carbon Dioxide*. International Journal of Molecular Sciences, 2011. **12**(11): p. 7708-7719.

51. Fayad, L., F. Cabanillas, M. Talpaz, P. McLaughlin, and R. Kurzrock, *High serum interleukin-6 levels correlate with a shorter failure-free survival in indolent lymphoma*. Leukemia & Lymphoma, 1998. **30**(5-6): p. 563-571.
52. Bochner, B.H., J.P. Stein, D.A. Ginsberg, E. Kurzrock, A.J. Figueroa, and D.G. Skinner, *A serous lined antireflux valve: In-vivo fluorourodynamic evaluation of a novel antireflux and continence mechanism*. Journal of Urology, 1998. **159**(5): p. 52-52.
53. Domingues, R.M.A., M.M.R. de Melo, C.P. Neto, A.J.D. Silvestre, and C.M. Silva, *Measurement and modeling of supercritical fluid extraction curves of Eucalyptus globulus bark: Influence of the operating conditions upon yields and extract composition*. Journal of Supercritical Fluids, 2012. **72**: p. 176-185.
54. Danh, L.T., D.A.T. Ngo, T.N.H. Le, J. Zhao, R. Mammucari, and N. Foster, *Antioxidant activity, yield and chemical composition of lavender essential oil extracted by supercritical CO₂*. Journal of Supercritical Fluids, 2012. **70**: p. 27-34.
55. Comin, L.M., F. Temelli, and M.A. Saldana, *Supercritical CO₂ Extraction of Flax Lignans*. Journal of the American Oil Chemists Society, 2011. **88**(5): p. 707-715.
56. Giles, F.J., A.R. Keating, H.M. Kantarjian, R. Kurzrock, and M. Talpaz, *Interleukin 4 (IL-4) is not effective in myelofibrosis (MF)*. Blood, 1998. **92**(10): p. 425a-425a.
57. Kurzrock, E.A., L.S. Baskin, and B.A. Kogan, *Gastrocystoplasty: Long term follow up*. Pediatrics, 1998. **102**(3): p. 847-847.
58. Zarena, A.S. and K.U. Sankar, *Xanthones enriched extracts from mangosteen pericarp obtained by supercritical carbon dioxide process*. Separation and Purification Technology, 2011. **80**(1): p. 172-178.
59. Akay, S., I. Alpak, and O.Y. Celiktas, *Supercritical CO₂ Extraction And Optimization of Total Phenols From Strawberry tree (Arbutus unedo L.) Fruits: A Comparative Study*. Planta Medica, 2011. **77**(12): p. 1372-1372.
60. Ghasemi, E., F. Raofie, and N.M. Najafi, *Application of response surface methodology and central composite design for the optimisation of supercritical fluid extraction of essential oils from Myrtus communis L. leaves*. Food Chemistry, 2011. **126**(3): p. 1449-1453.
61. Malaman, F.S., L.A.B. Moraes, C. West, N.J. Ferreira, and A.L. Oliveira, *Supercritical fluid extracts from the Brazilian cherry (Eugenia uniflora L.): Relationship between the extracted compounds and the characteristic flavour intensity of the fruit*. Food Chemistry, 2011. **124**(1): p. 85-92.
62. Plander, S., L. Gontaru, B. Blazics, K. Veres, A. Kery, S. Kareth, and B. Simandi, *Major antioxidant constituents from Satureja hortensis L. extracts obtained with different solvents*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2012. **114**(7): p. 772-779.

63. Jokic, S., Z. Zekovic, S. Vidovic, R. Sudar, I. Nemet, M. Bilic, and D. Velic, *Supercritical CO₂ extraction of soybean oil: process optimisation and triacylglycerol composition*. International Journal of Food Science and Technology, 2010. **45**(9): p. 1939-1946.
64. Akgun, I.H., A. Erkucuk, M. Pilavtepe, and O. Yesil-Celiktas, *Optimization of total alkannin yields of *Alkanna tinctoria* by using sub- and supercritical carbon dioxide extraction*. Journal of Supercritical Fluids, 2011. **57**(1): p. 31-37.
65. Prado, J.M., I. Dalmolin, N.D.D. Carareto, R.C. Basso, A.J.A. Meirelles, J.V. Oliveira, E.A.C. Batista, and M.A.A. Meireles, *Supercritical fluid extraction of grape seed: Process scale-up, extract chemical composition and economic evaluation*. Journal of Food Engineering, 2012. **109**(2): p. 249-257.
66. Brunner, G., *Gas separation*. Berlim, 1994, Springer.
67. Sovova, H., *Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation*. Journal of Supercritical Fluids, 2005. **33**(1): p. 35-52.
68. Zizovic, I., M. Stamenic, A. Orlovic, and D. Skala, *Supercritical carbon dioxide essential oil extraction of Lamiaceae family species: Mathematical modelling on the micro-scale and process optimization*. Chemical Engineering Science, 2005. **60**(23): p. 6747-6756.
69. Hong, I.K., S.W. Rho, K.S. Lee, W.H. Lee, and K.P. Yoo, *Modeling of Soybean Oil Bed Extraction with Supercritical Carbon-Dioxide*. Korean Journal of Chemical Engineering, 1990. **7**(1): p. 40-46.
70. Luque de Castro, M.D. and F. Priego-Capote, *Soxhlet extraction: Past and present panacea*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(16): p. 2383-2389.
71. de Castro, M.D.L. and F. Priego-Capote, *Soxhlet extraction: Past and present panacea*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(16): p. 2383-2389.
72. Wang, L.J. and C.L. Weller, *Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants*. Trends in Food Science & Technology, 2006. **17**(6): p. 300-312.
73. Janknecht, P., P.A. Wilderer, C. Picard, A. Larbot, and J. Sarrazin, *Investigations on ozone contacting by ceramic membranes*. Ozone-Science & Engineering, 2000. **22**(4): p. 379-392.
74. Ferreira, S.L.C., R.E. Bruns, H.S. Ferreira, G.D. Matos, J.M. David, G.C. Brandao, E.G.P. da Silva, L.A. Portugal, P.S. Reis, A.S. Souza, and W.N.L. dos Santos, *Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods*. Analytica Chimica Acta, 2007. **597**(2): p. 179-186.
75. Montgomery, D.C. *Design and analysis of experiments*. 5^a ed. Nova Iorque, 2001, John Wiley & Sons.

76. Bezerra, M.A., R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, and L.A. Escaleira, *Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry*. Talanta, 2008. **76**(5): p. 965-977.
77. Hall, A., C. Neves, and A. Pereira. *Grande maratona de estatística no SPSS*. Aveiro, 2011, Escolar editora.
78. Illy, A. and R. Viani, *Expresso Coffee - The chemistry of quality* 1995, London.
79. Harris, C. *Quantitative chemical analysis*. 7^a ed. Nova Iorque, 2007, WH Freeman and Company.
80. Dias, R.C.E., F.G. Campanha, L.G.E. Vieira, L.P. Ferreira, D. Pot, P. Marraccini, and M.D. Benassi, *Evaluation of Kahweol and Cafestol in Coffee Tissues and Roasted Coffee by a New High-Performance Liquid Chromatography Methodology*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(1): p. 88-93.
81. Araujo, J.M.A. and D. Sandi, *Extraction of coffee diterpenes and coffee oil using supercritical carbon dioxide*. Food Chemistry, 2007. **101**(3): p. 1087-1094.
82. Oliveira, L.S., A.S. Franca, R.R.S. Camargos, and V.P. Ferraz, *Coffee oil as a potential feedstock for biodiesel production*. Bioresource Technology, 2008. **99**(8): p. 3244-3250.
83. Ayalogu, E.O., J. Snelling, D.F.V. Lewis, S. Talwar, M.N. Clifford, and C. Ioannides, *Induction of Hepatic Cyp1a2 by the Oral-Administration of Caffeine to Rats - Lack of Association with the Ah Locus*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease, 1995. **1272**(2): p. 89-94.
84. Misik, M., C. Hoelzl, K.H. Wagner, C. Cavin, B. Moser, M. Kundi, T. Simic, L. Elbling, N. Kager, F. Ferk, V. Ehrlich, A. Nersesyan, M. Dusinska, B. Schilter, and S. Knasmüller, *Impact of paper filtered coffee on oxidative DNA-damage: Results of a clinical trial*. Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2010. **692**(1-2): p. 42-48.
85. de Souza, A.L., R. Garcia, R.F.D. Valadares, M.L.A. Pereira, L.D. Cabral, and S.D. Valadares, *Coffee hulls in diet of lactating dairy cows: nitrogen balance and microbial protein synthesis*. Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science, 2006. **35**(4): p. 1860-1865.
86. Pitzer, K.S. and D.R. Schreiber, *Improving equation-of-state accuracy in the critical region; equations for carbon dioxide and neopentane as examples*. Fluid Phase Equilibria, 1988. **41**(1-2): p. 1-17.

Anexos

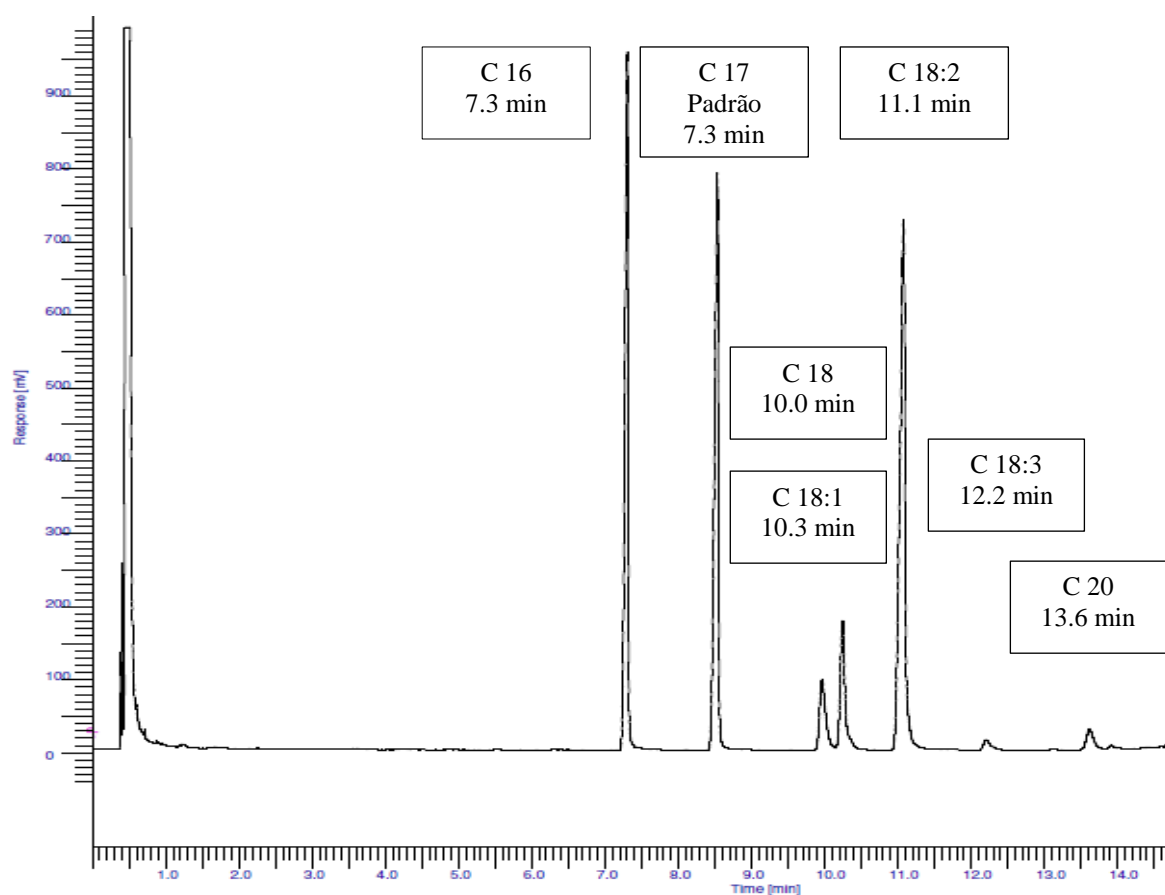


Figura A. 1 – Cromatograma do perfil de ácidos gordos em triacilglicerídeos obtido por GC.

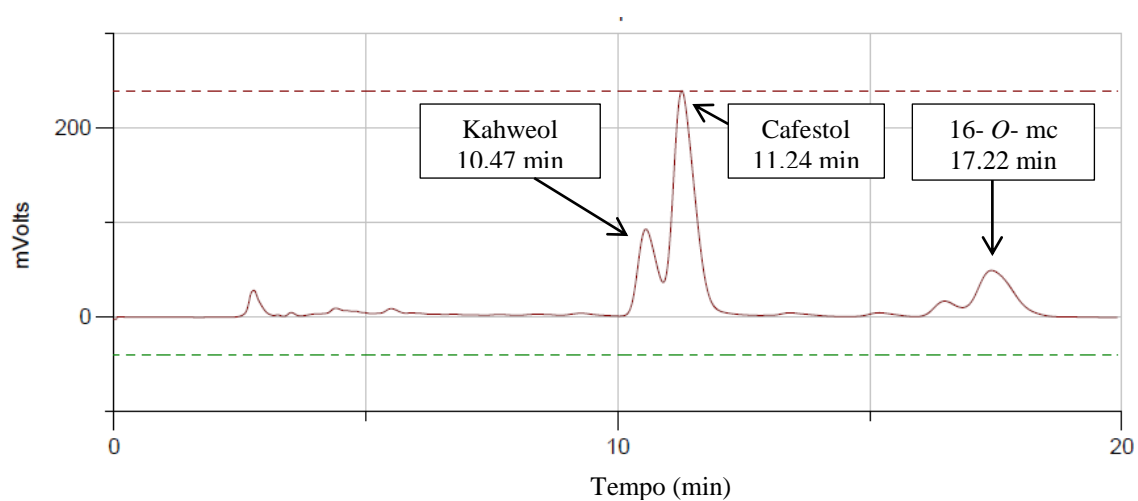


Figura A. 2 - Cromatograma dos diterpenos maioritários obtido por HPLC.

**Tabela A. 1-** Coeficientes da regressão para o modelo reduzido da resposta de superfície relativo ao rendimento em óleo.

Variável	Coeficiente regressão Equação		<i>p</i> (t-student)
	β_0	9.92385	0.000287
X_P	β_1	1.99125	0.00384
$X_P X_P$	β_{11}	-2.60625	0.002247
X_T	β_2	-1.43923	0.015552
$X_T X_T$	β_{22}	2.0775	0.003529
X_{EtOH}	β_3	-0.95673	0.034194
$X_{EtOH} X_{EtOH}$	β_{33}	1.325	0.017
$X_P X_T$	β_{12}	1.0975	0.024495
$X_T X_{EtOH}$	β_{23}	9.92385	0.000287
R^2	0.974	$R^2_{ajustado}$	0.948

Tabela A. 2 - Coeficientes da regressão para o modelo reduzido da resposta de superfície relativo ao rendimento em diterpenos.

Variável	Coeficiente regressão Equação		<i>p</i> (t-student)
	β_0	0.596	0.000639
X_P	β_1	0.1045	0.017721
X_T	β_2	-0.15363	0.008318
$X_T X_T$	β_{22}	-0.08913	0.049667
$X_P X_T$	β_{12}	0.10775	0.03258
$X_T X_{EtOH}$	β_{23}	0.1385	0.020104
R^2	0.901	$R^2_{ajustado}$	0.846

**Tabela A. 3** - Coeficientes da regressão para o modelo reduzido da resposta de superfície relativo à concentração do óleo em diterpenos.

Variável	Coeficiente regressão Equação		p (t-student)
	β_0	60.8062	0.000361
$X_P X_P$	β_{11}	-5.5383	0.047212
X_{EtOH}	β_3	-16.3812	0.002684
$X_{EtOH} X_{EtOH}$	β_{33}	16.5767	0.00562
$X_P X_T$	β_{12}	6.165	0.036009
$X_P X_{EtOH}$	β_{23}	7.5425	0.024492
R^2	0.875	$R^2_{ajustado}$	0.806

Tabela A. 4 - ANOVA para o modelo geral da concentração total de diterpenos no óleo de resíduo de café.

	SS	GL	MS	F	p
X_P	46.61	1	46.61	8.0569	0.10494
$X_P X_P$	121.847	1	121.847	21.0625	0.044344
X_T	19.282	1	19.282	3.3331	0.209441
$X_T X_T$	26.561	1	26.561	4.5913	0.165392
X_{EtOH}	2146.763	1	2146.763	371.0891	0.002684
$X_{EtOH} X_{EtOH}$	989.504	1	989.504	171.0454	0.005796
$X_P X_T$	152.029	1	152.029	26.2797	0.036009
$X_P X_{EtOH}$	227.557	1	227.557	39.3355	0.024492
$X_T X_{EtOH}$	4.244	1	4.244	0.7335	0.481975
Falta de ajustamento	421.433	3	140.478	24.2829	0.039812
Erro puro	11.57	2	5.785		
Total SS	4245.397	14			
R^2		0.898	$R^2_{ajustado}$		0.714

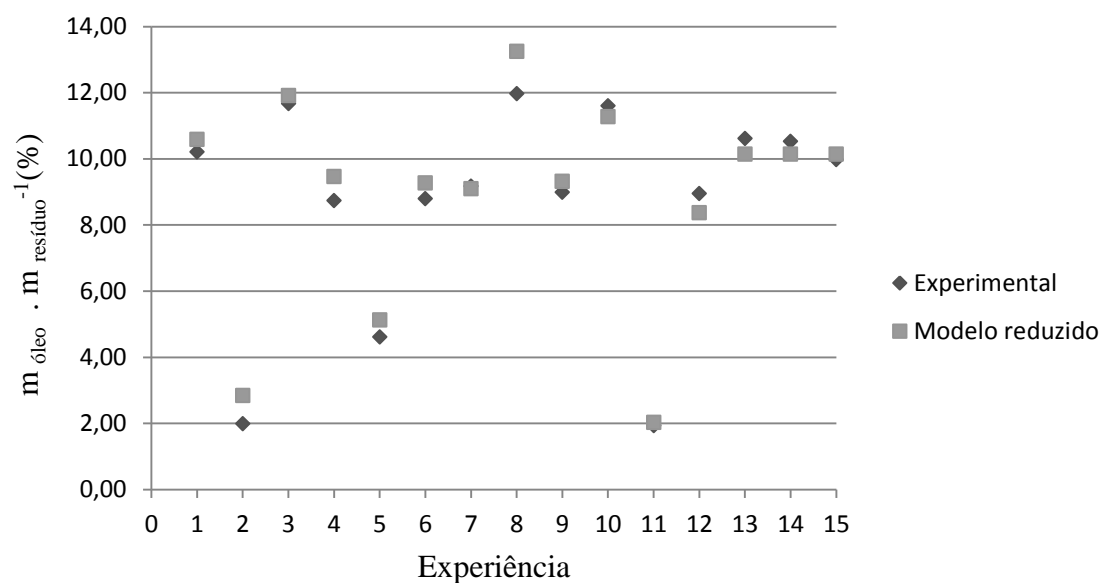


Figura A. 3 - Valores experimentais e previstos pelo modelo reduzido relativo ao rendimento em óleo do café.

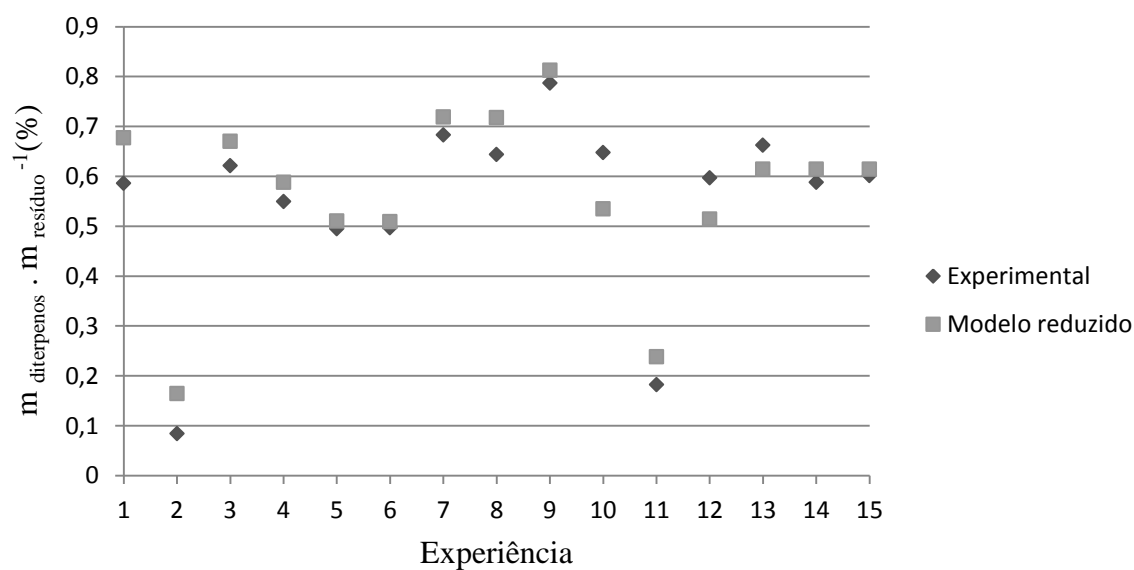


Figura A. 4 - Valores experimentais e previstos pelo modelo reduzido relativo ao rendimento em diterpenos do óleo do café.

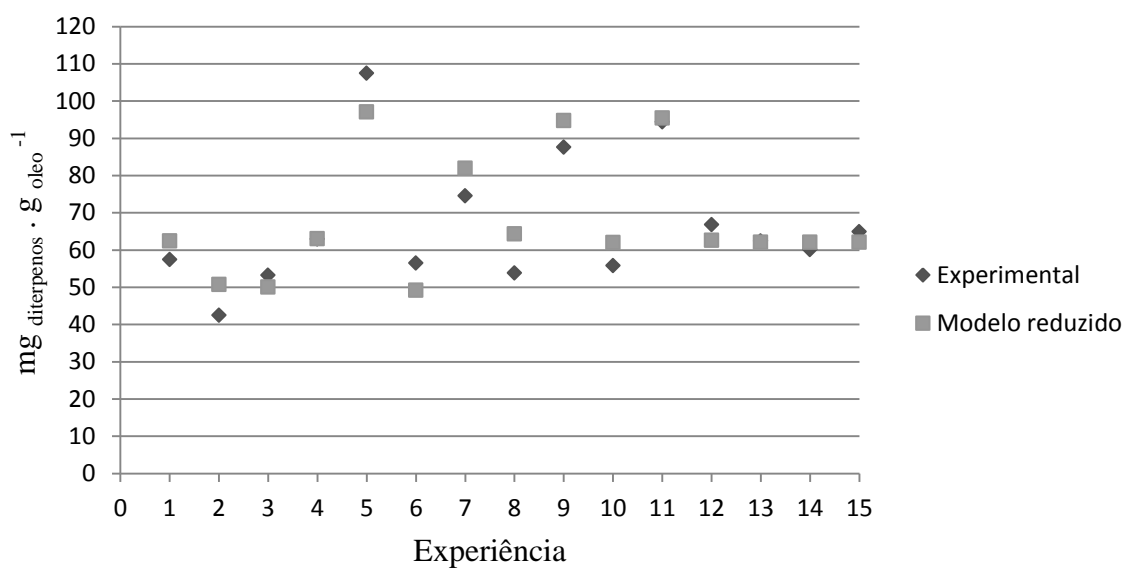


Figura A. 5 - Valores experimentais e previstos pelo modelo reduzido relativo à concentração de diterpenos no óleo de café.

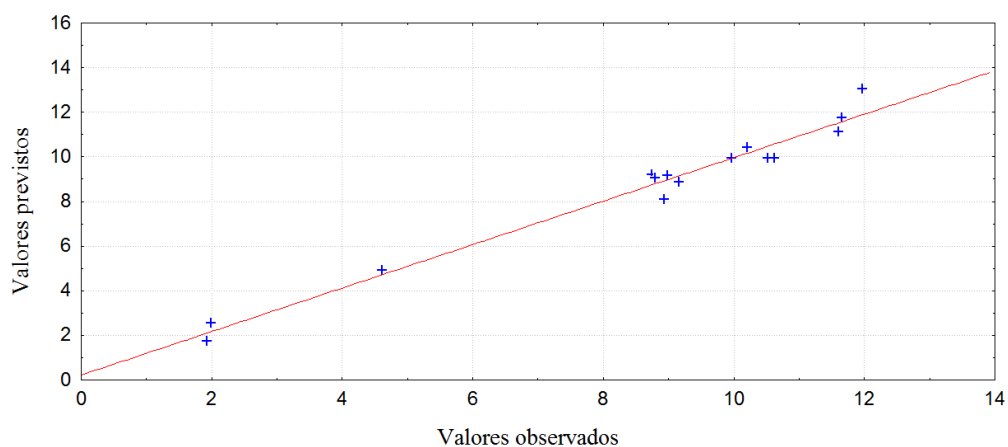


Figura A. 6 – Gráfico de valores observados vs valores previstos relativo ao rendimento em óleo.

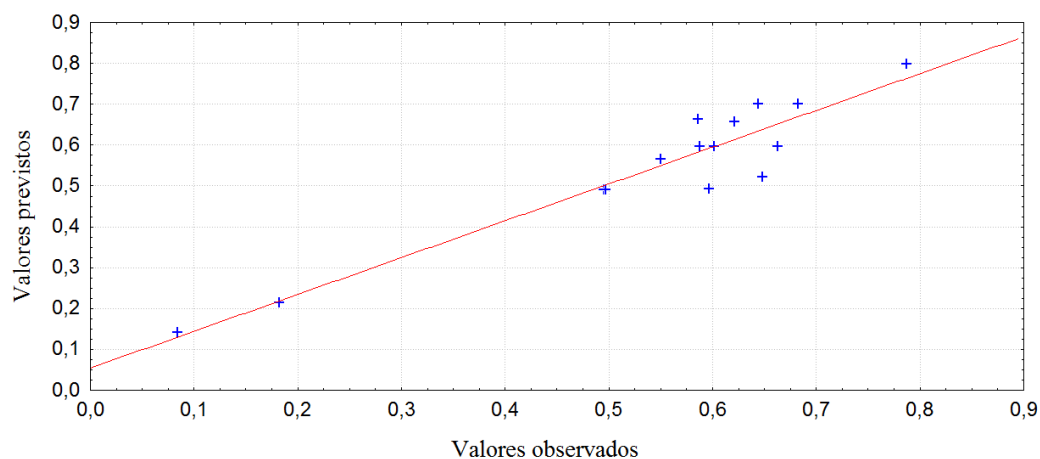


Figura A. 7 - Gráfico de valores observados vs valores previstos relativo ao rendimento em diterpenos.

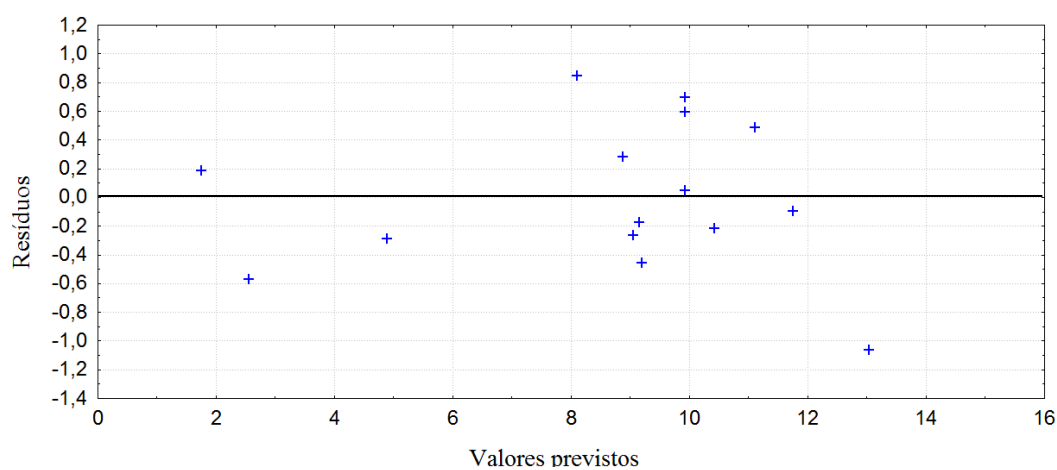


Figura A. 8 – Gráfico de resíduos relativo ao rendimento em óleo.

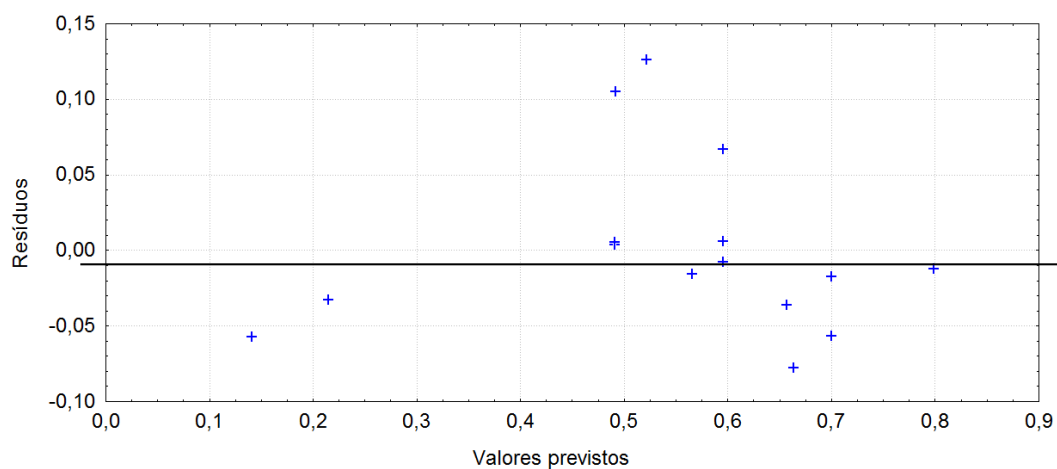


Figura A. 9 - Gráfico de resíduos relativo ao rendimento em diterpenos.

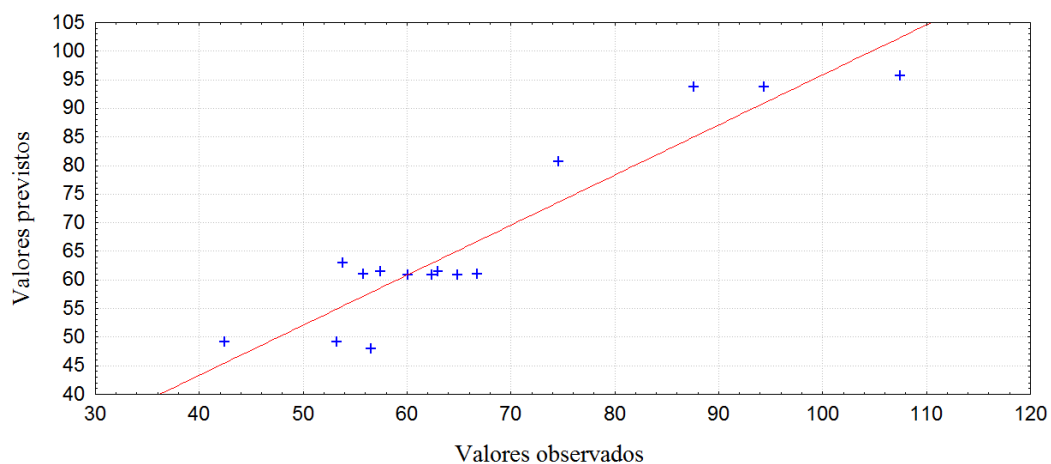


Figura A. 10 - Gráfico de valores observados vs valores previstos relativa à concentração em diterpenos.

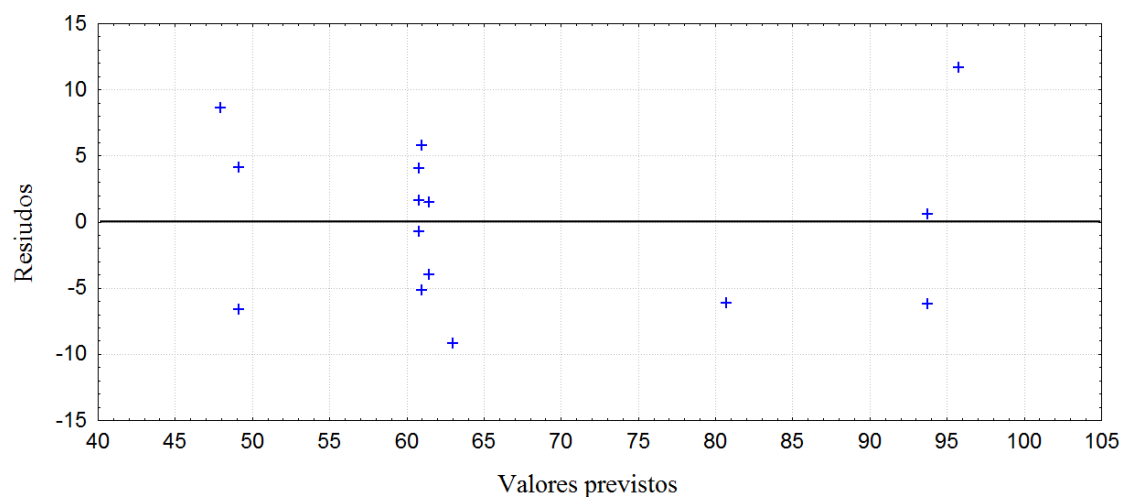


Figura A. 11 - Gráfico de resíduos relativo à concentração em diterpenos.